

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 10 月 9 日 (09.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/082320 A1

(51) 国際特許分類: A61K 38/17, 39/395, 45/00, 48/00,
A61P 9/00, 11/00, 13/00, 15/00, 21/00, 25/00, 43/00

(NOGUUCHI, Yuko) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県 つくば
市 二の宮 4 丁目 1 3-1 2-3 0 1 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/03828

(74) 代理人: 高橋 秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.);
〒532-0024 大阪府 大阪市淀川区 十三本町 2 丁目
1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Os-
aka (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年 3 月 27 日 (27.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-093045 2002 年 3 月 28 日 (28.03.2002) JP
特願2002-361580
2002 年 12 月 13 日 (13.12.2002) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区 道修
町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 伊藤 康明
(ITO, Yasuaki) [JP/JP]; 〒300-0832 茨城県 土浦市
桜ヶ丘町 3 6-1 6 Ibaraki (JP). 篠原 徳之 (SHINO-
HARA, Tokuyuki) [JP/JP]; 〒305-0047 茨城県 つくば
市 千現 1 丁目 1 8-5-5 0 5 Ibaraki (JP). 細谷 昌
樹 (HOSOYA, Masaki) [JP/JP]; 〒300-0007 茨城県 土
浦市 板谷 1 丁目 7 1 1-8 3 Ibaraki (JP). 日沼 州司
(HINUMA, Shuji) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば
市 春日 1 丁目 7-9-1 4 0 2 Ibaraki (JP). 野口 優子

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受
領の際には再公開される。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL SCREENING METHOD

(54) 発明の名称: 新規スクリーニング方法

(57) Abstract: Using a novel G protein-coupled receptor protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or its salt together with β -alanine or L-carnosine, an agonist or an antagonist to the receptor protein or its salt can be efficiently screened.

(57) 要約: 配列番号: 2 または配列番号: 4 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩と β -アラニンまたは L-カルノシンを用いることにより、該レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストを効率良くスクリーニングすることができる。

明 細 書

新規スクリーニング方法

5 技術分野

本発明は、ヒトおよびラット由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質（TGR7およびrCB7T084）の用途に関する。

背景技術

- 10 多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質のうち多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein（以下、G蛋白質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また、7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていること
- 15 から、G蛋白質共役型レセプター蛋白質（GPCR）あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質（7TMR）と総称される。

- G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えば、ホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。レ
- 20 セプター蛋白質は生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

- 各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。
- 25

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対

応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内には未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター蛋白質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプター蛋白質においてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

5 生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であ

10 った。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベース

15 に登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

ラット由来のrCB7T084のアミノ酸配列およびそれをコードするDNAが報告されている(特開2000-17569号)。また、rCB7T084と高い相同性を有するヒト由来のTGR7のアミノ酸配列およびそれをコードするDNAが報告されている(WO 01/83748号、WO 01/66750号、WO 01/48188号、WO 01/36471号、WO 01/57085号、WO 01/70814号)。しかしながら、これらのG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能およびその生理的リガンドは解明されて

20 いなかった。

25 従来、G蛋白質共役型レセプター蛋白質と生理活性物質(すなわち、リガンド)との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質(すなわち、リガンド)と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプター蛋白質の特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品とし

て活用されてきた。従って、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の特異的リガンドを決定することは、医薬品開発の標的ともなりうるアゴニスト、アンタゴニストを見出す際に、非常に重要な手段となる。

5 しかし、現時点でもなお、機能未知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、また対応するリガンドが同定されていない、いわゆるオーファンレセプター蛋白質が多数存在しており、G蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンド探索および機能解明が切望されている。

10 G蛋白質共役型レセプター蛋白質は、そのシグナル伝達作用を指標とする、新たな生理活性物質（すなわち、リガンド）の探索、また、該レセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストの探索に有用である。一方、生理的なリガンドが見出されなくても、該レセプター蛋白質の不活化実験（ノックアウト動物）から該レセプター蛋白質の生理作用を解析することにより、該レセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを作製することも可能である。これら該レセプター蛋白質に対するリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全や機能亢進
15 に関連する疾患の予防・治療薬や診断薬として活用することが期待できる。

20 さらにまた、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の遺伝子変異に基づく、生体での該レセプター蛋白質の機能の低下または亢進が、何らかの疾患の原因となっている場合も多い。この場合には、該レセプター蛋白質に対するアンタゴニストやアゴニストの投与だけでなく、該レセプター蛋白質遺伝子の生体内（またはある特定の臓器）への導入や、該レセプター蛋白質遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子治療に応用することもできる。この場合には該レセプター蛋白質の塩基配列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプター蛋白質の遺伝子は、該レセプター蛋白質の機能不全に関与する疾患の予防・治療薬や診断薬に応用することもできる。
25

 本発明は、機能未知のオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定および該G蛋白質共役型レセプター蛋白質とそのリガンドの用途に関する。すなわち、本発明は、リガンドと該G蛋白質共役型レセプ

- ター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られうるリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩、およびリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）もしくは該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供することを目的とする。

10 発明の開示

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ラット由来の rCB7T084 およびヒト由来の TGR7 のリガンドが β -アラニンまたは L-カルノシンであることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

15 すなわち、本発明は、

[1] 配列番号：2 または配列番号：4 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する G 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる中枢または末梢神経機能調節剤、

- 20 [2] 配列番号：2 または配列番号：4 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する G 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる抗不安剤、催眠鎮静剤、筋弛緩剤、麻酔増強剤、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳
- 25 血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療剤、

[3] 配列番号：2 または配列番号：4 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは

は実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる中枢または末梢神経機能調節剤、

- [4] 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは
- 5 は実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる抗不安剤、催眠鎮静剤、筋弛緩剤、麻酔増強剤、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、
- 10 痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療剤、

- [5] 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは
- 15 は実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる中枢または末梢神経機能異常の診断剤、

- [6] 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは
- 20 は実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる不安症、不眠症、興奮症、筋萎縮症、麻酔感受性、痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏、
- 25 しびれ、運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難または感覚麻痺の診断剤、

[7] 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは

は実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質も

しくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる中枢または末梢神経機能調節剤、

- 5 [8] 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺の予防・治療剤、

- 10 [9] 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドを含有してなる中枢または末梢神経機能調節剤、

- 15 [10] 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドを含有してなる運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺の予防・治療剤、

- 20 [11] (1) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) β -アラニンまたはL-カルノシンを用いることを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩と β -アラニンまたはL-カルノシンとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 25 [12] (1) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) β -アラニンまたはL-カルノシンを含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩と β

-アラニンまたはL-カルノシンとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

5 [13] 上記[11]記載のスクリーニング方法または上記[12]記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、 β -アラニンまたはL-カルノシンと配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

10 [14] (1) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) 該レセプター蛋白質またはその塩と β -アラニンまたはL-カルノシンとの結合性を変化させる化合物またはその塩を用いることを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、

15 [15] (1) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) 該レセプター蛋白質またはその塩と β -アラニンまたはL-カルノシンとの結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用キット、

20 [16] β -アラニンまたはL-カルノシンと配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

[17] 中枢または末梢神経機能調節剤である上記[16]記載の医薬、

25 [18] (1) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) β -アラニンを用いることを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩と β -アラニンとの結合性を

変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 5 [19] (1) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) β -アラニンを含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩と β -アラニンとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

- 10 [20] 上記[18]記載のスクリーニング方法または上記[19]記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、 β -アラニンと配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

- 15 [21] (1) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) 該レセプター蛋白質またはその塩と β -アラニンとの結合性を変化させる化合物またはその塩を用いることを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、

- 20 [22] (1) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) 該レセプター蛋白質またはその塩と β -アラニンとの結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用キット、

- 25 [23] β -アラニンと配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

- [24] 中枢または末梢神経機能調節剤である上記[16]記載の医薬、

- [25] 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストを含有してなる抗不安剤、催眠鎮静剤、筋弛緩剤、麻酔増強剤、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療剤、

- 10 [26] 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアンタゴニストを含有してなる運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺の予防・治療剤、

- 15 [27] 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、当該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させ、中枢または末梢神経機能を調節する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 20 [28] 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる、当該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させ、中枢または末梢神経機能を調節する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

- 25 [29] 上記[27]記載のスクリーニング方法または上記[28]記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有す

るG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させ、中枢または末梢神経機能を調節する作用を有する化合物またはその塩、

[30] 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物またはその塩を含有して

5

[31] 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を増加させる化合物またはその塩を含有して

10

なる抗不安剤、催眠鎮静剤、筋弛緩剤、麻酔増強剤、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくははし

15

びれの予防・治療剤、

[32] 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を減少させる化合物またはその塩を含有して

20

なる運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺の予防・治療剤、

[33] 試験化合物を配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における細胞内cAMP生成抑制活性を測定することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩に対する

25

アゴニストのスクリーニング方法、

[34] β -アラニンまたはL-カルノシンを含有してなる配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達作用増強剤、

[35] 中枢または末梢神経機能調節剤である上記[34]記載の剤、

[36] 抗不安剤、催眠鎮静剤、筋弛緩剤、麻酔増強剤、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、
5 脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療剤である上記[34]記載の剤、

[37] β -アラニンを含有してなる配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質
10 質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達作用増強剤、

[38] 中枢または末梢神経機能調節剤である上記[37]記載の剤、

[39] 抗不安剤、催眠鎮静剤、筋弛緩剤、麻酔増強剤、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、
15 脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療剤である上記[37]記載の剤、

[40] 哺乳動物に対して、①配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共
20 役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩、②配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、または③配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一

25 のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストの有効量を投与することを特徴とする抗不安方法、催眠鎮静方法、筋弛緩方法、麻酔増強方法、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失

調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療方法、

- 5 [41] 哺乳動物に対して、①配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、②配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド、または③配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアンタゴニストの有効量を投与することを特徴とする運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺の予防・治療方法、
- 10
- 15

- [42] 抗不安剤、催眠鎮静剤、筋弛緩剤、麻酔増強剤、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療剤を製造するための①配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩、②配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、または③配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する
- 20
- 25

アゴニストの使用、

- 5 [43] 運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、
排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺の予防・治療剤を製造
するための①配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一
もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋
白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、②配列番号：2または配
列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配
列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコー
ドするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列また
10 はその一部を含有してなるポリヌクレオチド、または③配列番号：2または配
列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配
列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するアンタゴニストの使用、
[44] 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もし
しくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質
15 もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる中枢また
は末梢神経機能異常の診断剤、および
[45] 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もし
しくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質
もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる不安症、
20 不眠症、興奮症、筋萎縮症、麻酔感受性、痙攣、依存症、精神分裂病、てんか
ん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神
経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸
部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変
性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏、しびれ、運動機能失調症、
25 麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸
困難または感覚麻痺の診断剤を提供する。

さらに、本発明は、

- [46] (i) 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同

一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質（以下、本発明GPCRと略記する場合もある）その部分ペプチドまたはその塩と、 β -アラニンまたはL-カルノシンとを接触させた場合と、（ii）本発明GPCR、その部分ペプチドまたはその塩と、 β -アラニンまたはL-カルノシンおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記[11]のスクリーニング方法、

[47]（i）標識した β -アラニンまたはL-カルノシンを本発明GPCR、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、（ii）標識した β -アラニンまたはL-カルノシンおよび試験化合物を本発明GPCR、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識した β -アラニンまたはL-カルノシンの本発明GPCR、その部分ペプチドまたはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記[11]のスクリーニング方法、

[48]（i）標識した β -アラニンまたはL-カルノシンを本発明GPCRを含有する細胞に接触させた場合と、（ii）標識した β -アラニンまたはL-カルノシンおよび試験化合物を本発明GPCRを含有する細胞に接触させた場合における、標識した β -アラニンまたはL-カルノシンの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記[11]のスクリーニング方法、

[49]（i）標識した β -アラニンまたはL-カルノシンを本発明GPCRを含有する細胞の膜面分に接触させた場合と、（ii）標識した β -アラニンまたはL-カルノシンおよび試験化合物を本発明GPCRを含有する細胞の膜面分に接触させた場合における、標識した β -アラニンまたはL-カルノシンの該細胞の膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記[11]のスクリーニング方法、

[50]（i）標識した β -アラニンまたはL-カルノシンを、本発明GPCRをコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現した本発明GPCRに接触させた場合と、（ii）標識した β -アラニンまたはL-カルノシンおよび試験化合物を当該形質転換体の細胞膜に発現した本発明GPCRに接

触させた場合における、標識した β -アラニンまたはL-カルノシンの本発明GPCRに対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記[11]のスクリーニング方法、

5 [51] (i) 本発明GPCRを活性化する化合物を本発明GPCRを含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 本発明GPCRを活性化する化合物および試験化合物を本発明GPCRを含有する細胞に接触させた場合における、本発明GPCRを介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする上記[11]のスクリーニング方法、

10 [52] 本発明GPCRを活性化する化合物を、本発明GPCRをコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現した本発明GPCRに接触させた場合と、本発明GPCRを活性化する化合物および試験化合物を当該形質転換体の細胞膜に発現した本発明GPCRに接触させた場合における、本発明GPCRを介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする上記[11]のスクリーニング方法、

15 [53] 本発明GPCRを活性化する化合物が β -アラニンまたはL-カルノシンである上記[51]または[52]のスクリーニング方法、

[54] 本発明GPCRを含有する細胞またはその膜画分を含有することを特徴とする上記[12]のスクリーニング用キット、

20 [55] 本発明GPCRをコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現した本発明GPCRを含有することを特徴とする上記[12]のスクリーニング用キット、

25 [56] 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を用いることを特徴とする、中枢もしくは末梢神経機能調節薬、または不安症、不眠症、興奮症、筋萎縮症、麻酔感受性、痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失

調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏、しびれ、運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難も

5 しくは感覚麻痺の予防・治療薬が該レセプター蛋白質またはその塩に結合することを確認する方法、

10 [57] 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を用いることを特徴とする、中枢もしくは末梢神経機能調節薬、または不安症、不眠症、興奮症、筋萎縮症、麻酔感受性、痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療薬が該

15 レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストであることを確認する方法、

20 [58] 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を用いることを特徴とする、中枢もしくは末梢神経機能調節薬、または運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症もしくは感覚麻痺の予防・治療薬が該レセプター蛋白質またはその塩に対するアンタゴニストであることを確認する方法、および

25 [59] 各薬を該レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、各薬と該レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩との結合量を測定することを特徴とする上記[56]～[58]記載の確認方法等を提供する。

図面の簡単な説明

図1はTGR7を発現するCHO-K1細胞にβアラニンを添加したときの細胞内Ca²⁺濃度の変化を調べた結果を示す。縦軸のCountsは細胞内C

Ca^{2+} 濃度を示す蛍光強度、横軸のTime (sec) は測定開始後の時間経過 (秒) を示す。○は 10^{-4}M 、▲は 10^{-5}M 、□は 10^{-6}M を示す。

図2はrCB7T084を発現するCHO-K1細胞にβ-アラニンを添加したときの細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を調べた結果を示す。縦軸のCountsは

5 細胞内 Ca^{2+} 濃度を示す蛍光強度、横軸のTime (sec) は測定開始後の時間経過 (秒) を示す。○は 10^{-4}M 、▲は 10^{-5}M 、□は 10^{-6}M を示す。

図3は発現ベクターのみ (インサートなし) を発現するCHO-K1細胞にβ-アラニンを添加したときの細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を調べた結果を示す。縦軸のCountsは細胞内 Ca^{2+} 濃度を示す蛍光強度、横軸のTime (sec) は測定開始後の時間経過 (秒) を示す。○は 10^{-4}M 、▲は 10^{-5}M 、□

10 は 10^{-6}M を示す。

図4はRT-PCRによるTGR7 mRNAのヒトにおける組織分布図を示す。copies/ng mRNAはmRNA ng当たりのコピー数を示す。

図5はRT-PCRによるrCB7T084 mRNAのラットにおける組織分布図を示す。copies/ng mRNAはmRNA ng当たりのコピー数を示す。

図6はTGR7およびrCB7T084を発現させたCHO細胞における、ホルスコリン添加によって増加させた細胞内cAMP量のβ-アラニンによる抑制作用を調べた結果を示す。TGR7はTGR7を発現させたCHO細胞を、rCB7T084はrCB7T084を発現させたCHO細胞を、Mockはベクターのみを導入したCHO細胞を用いた時の結果を示す。Basalはホルスコリンで刺激しない状態を示す。Fskはホルスコリンを $1\mu\text{M}$ 添加した場合を示す。横軸は添加したβ-アラニンの濃度を示し、 $1\text{E}-03$ は $1.0 \times 10^{-3}\text{M}$ 、 $3\text{E}-04$ は $3.0 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 $1\text{E}-04$ は $1.0 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 $3\text{E}-05$ は $3.0 \times 10^{-5}\text{M}$ 、 $1\text{E}-05$ は $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ 、 $3\text{E}-06$ は $3.0 \times 10^{-6}\text{M}$ 、 $1\text{E}-06$ は $1.0 \times 10^{-6}\text{M}$ 、 $3\text{E}-07$ は $3.0 \times 10^{-7}\text{M}$ を示す。縦軸は細胞内cAMP量を示す。

図7はTGR7およびrCB7T084を発現させたCHO細胞における、ホ

- ルスコリン添加によって増加させた細胞内 c AMP 量の L-カルノシンによる抑制作用を調べた結果を示す。TGR 7 は TGR 7 を発現させた CHO 細胞を、rCB 7 T 0 8 4 は rCB 7 T 0 8 4 を発現させた CHO 細胞を、Mock はベクターのみを導入した CHO 細胞を用いた時の結果を示す。Basal はホルスコリンで刺激しない状態を示す。Fsk はホルスコリンを $1 \mu\text{M}$ 添加した場合を示す。横軸は添加した L-カルノシンの濃度を示し、 $1 \text{E}-03$ は $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 、 $3 \text{E}-04$ は $3.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $1 \text{E}-04$ は $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $3 \text{E}-05$ は $3.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $1 \text{E}-05$ は $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $3 \text{E}-06$ は $3.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $1 \text{E}-06$ は $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $3 \text{E}-07$ は $3.0 \times 10^{-7} \text{M}$ を示す。縦軸は細胞内 c AMP 量を示す。

図 8 は RT-PCR による rCB 7 T 0 8 4 mRNA のラット後根神経節および脊髄における発現量を示す。Copies / 25 ng total RNA は total RNA 25 ng 当たりのコピー数を示す。

15 発明を実施するための最良の形態

本発明に用いられる G 蛋白質共役型レセプター蛋白質は、配列番号：2 または配列番号：4 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である。

- 本発明 GPCR は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓 β 細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、

5 大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳染、黒質)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来する蛋白質であってもよく、また合成蛋白質であってもよい。

10 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と約85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

15 本発明の配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

20 実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等(例、約0.01~100倍、好ましくは約0.5~20倍、より好ましくは約0.5~2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後に記載するスクリーニング方法に従って測定することができる。

25 また、本発明GPCRとしては、a) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、b) 配列番号：2または配列番号：4で表わされる

アミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、c) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1
5 ～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはd) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本明細書において本発明GPCRは、ペプチド標記の慣例に従って、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号
10 : 2で表わされるアミノ酸配列を含有するrCB7T084をはじめとする本発明GPCRは、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピルもしくは n -ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして
15 汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明GPCRがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明GPCRに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

25 さらに、本発明GPCRには、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミ

ノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-OH$ 、 $-SH$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

5 本発明GPCRの具体例としては、例えば、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列からなるラット由来のrCB7T084、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列からなるヒト由来のTGR7などが用いられる。前者は特開2000-175691、後者はWO 01/66750、WO 01/4818
10 8、WO 01/36471、WO 01/57085、WO 01/70814に記載されている公知の蛋白質である。

本発明GPCRの部分ペプチド（以下、単に部分ペプチドと略記する場合がある）としては、上記した本発明GPCRの部分アミノ酸配列を有するペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明GPCRの蛋白質分
15 子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、本発明GPCRと実質的に同質のレセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列を有する本発明GPCRの部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に
20 用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記した本発明のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、
25 より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質のレセプター活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質のレセプター活性」の測定は上記と同様に行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の部分ペプチドには、上記した本発明GPCRと同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明GPCRまたはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明GPCRまたはその塩は、上記したヒトや哺乳動物の細胞または組織

から自体公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載する本発明GPCRをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後に記載する蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

- 5 ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

- 10 本発明GPCRもしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-
15 2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル) フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル) フェノキシ樹脂などを挙げる事ができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出
20 すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質またはそのアミド体を取得する。

- 上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エ
25 チル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル) カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸

の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

5 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチル
10 ピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用い
15 られる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20~50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰
20 り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、C1-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、
20 トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状も
25 しくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボ

ニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、*Bz*1、*Cl*₂-*Bz*1、2-ニトロベンジル、*Br*-*Z*、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、*Tos*、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、*DNP*、ベンジルオキシメチル、*Bum*、*Boc*、*Trt*、*Fmoc*などが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、*HONB*、*N*-ヒドロキシスクシミド、*N*-ヒドロキシフタルイミド、*HOBT*）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、*Pd*-黒あるいは*Pd*-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、

ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（蛋白質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。

蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

本発明GPCRの部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明GPCRを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明GPCRを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基

を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下のa)～e)に記載された方法が挙げられる。

- a) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- b) SchroederおよびLuecke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- d) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学IV、205、(1977年)
- e) 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明G P C Rをコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明G P C Rをコードする塩基配列 (DNAまたはRNA、好ましくはDNA) を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明G P C RをコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA : RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖 (すなわち、コード鎖) であっても、アンチセンス鎖 (すなわち、非コード鎖) であってもよい。

本発明G P C Rをコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新P C Rとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明G P C RのmRNAを定量することができる。

本発明G P C RをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNA

ライブラリー、上記した細胞・組織由来の cDNA、上記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR 法と略称する) によって増幅することもできる。

具体的には、本発明 GPCR をコードする DNA としては、例えば、配列番号：1 または配列番号：3 で表わされる塩基配列を含有する DNA、または配列番号：1 または配列番号：3 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明 GPCR と実質的に同質の活性 (例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など) を有するレセプター蛋白質をコードする DNA であれば何れのものでもよい。

配列番号：1 または配列番号：3 で表わされる塩基配列とハイブリダイズできる DNA としては、例えば、配列番号：1 または配列番号：3 で表わされる塩基配列と約 85% 以上、好ましくは約 90% 以上、より好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列を含有する DNA などが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19~40 mM、好ましくは約 19~20 mM で、温度が約 50~70℃、好ましくは約 60~65℃ の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65℃ の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列からなるラット由

来 r C B 7 T 0 8 4 をコードする DNA としては、配列番号：1 で表わされる塩基配列からなる DNA などが用いられる。

配列番号：4 で表わされるアミノ酸配列からなるヒト由来 T G R 7 をコードする DNA としては、配列番号：3 で表わされる塩基配列からなる DNA などが用いられる。

本発明 G P C R をコードする DNA の塩基配列の一部、または該 DNA と相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードする DNA を包含するだけではなく、RNA をも包含する意味で用いられる。

- 10 本発明に従えば、本発明 G P C R 遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定された本発明 G P C R をコードする DNA の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、本発明 G P C R 遺伝子の RNA とハイブリダイズすることができ、該 RNA の合成または機能を阻
- 15 害することができるか、あるいは本発明 G P C R 関連 RNA との相互作用を介して本発明 G P C R 遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明 G P C R 関連 RNA の選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明 G P C R 関連 RNA と特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明 G P C R 遺伝子の発現を調節・制御する
- 20 のに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）
- 25 のアミノ酸を通常指している。本発明 G P C R 遺伝子の 5' 端ヘアピンループ、5' 端 6-ベースペア・リピート、5' 端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF 翻訳開始コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端パリンδροーム領域、および 3' 端ヘアピンループは好ましい対象領域

として選択しうるが、本発明GPCR遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

5 目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、対象物と「アンチセンス」であるとい
うことができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リ
ボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有し
10 ているポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシド
であるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有
するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核
酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマ
ーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許
容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2
15 本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNA
ハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または
非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば
当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化され
たもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌク
レオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、
20 ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、
電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホス
ホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレア
ーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンな
ど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、
25 インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、
キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属
など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つ
もの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオ
シド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基

を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであつてよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた
5 糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシド
10 アミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス
15 鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに
20 開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で
供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられる
ことができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格
25 の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステ

リルクロロホルレート、コール酸など)が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、上記した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、(1) 配列番号：1または配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2) 配列番号：1または配列番号：3で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明GPCRと実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：1または配列番号：3で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：1または配列番号：3で表わされる塩基配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 5 本発明G P C Rまたはその部分ペプチド（以下、包括的に本発明G P C Rと略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明G P C Rの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてP C R法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明G P C Rの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNA
- 10 を用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうこと
- 15 ができる。

- DNAの塩基配列の変換は、P C Rや公知のキット、例えば、Mut anTM—super Express Km（宝酒造（株））、Mut anTM—K（宝酒造（株））などを用いて、ODA—LA P C R法、Gapped duplex法、Kunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。
- 20 従って行なうことができる。

- クローン化された本発明G P C RをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な
- 25 合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

 本発明G P C Rの発現ベクターは、例えば、（イ）本発明G P C RをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、（ロ）該DNA断片を適当

な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

10 本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

15 これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

25 発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシ

ン耐性遺伝子（以下、Neor^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

- 5 また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、
- 10 宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明GPCRをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

- 15 宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

- エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. U
- 20 SA）, 60巻, 160（1968）〕, JM103〔ヌクイレック・アシッズ・リサーチ（Nucleic Acids Research）, 9巻, 309（1981）〕, JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Journal of Molecular Biology）, 120巻, 517（1978）〕, HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459（1969）〕, C600〔ジェ
- 25 ネットィックス（Genetics）, 39巻, 440（1954）〕などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス（*Bacillus subtilis*）MI114〔ジーン, 24巻, 255（1983）〕, 207-21〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Journal of Biochemistry）, 95巻, 87

(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D、20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) など
5 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。
10 ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

15 昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻) 細胞と略記)、
20 マウスL細胞、マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞、ヒトHEK293細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972) やジーン
25 (Gene), 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 11

1 (1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユ
5 ーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

10 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル. 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、本発明GPCRをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

15 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素
20 源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザ
25 ミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせ

るために、例えば、 3β -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 $15\sim 43^{\circ}\text{C}$ で約 $3\sim 24$ 時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

- 5 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ で約 $6\sim 24$ 時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や 0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約 $5\sim 8$ に調整するのが好ましい。培養は通常約 $20\sim 35^{\circ}\text{C}$ で約 $24\sim 72$ 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。
- 10
- 15

- 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約 $6.2\sim 6.4$ に調整するのが好ましい。培養は通常約 27°C で約 $3\sim 5$ 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。
- 20

- 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 $5\sim 20\%$ の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] な
- 25

どが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明G P C Rを生成せしめることができる。

- 5 上記培養物から本発明G P C Rを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明G P C Rを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊した
10 のち、遠心分離やろ過により本発明G P C Rの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に本発明G P C Rが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

- 15 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明G P C Rの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアク
20 リルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

- 25 かくして得られる本発明G P C Rが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する本発明G P C Rを、精製前または精製後に適当な

蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

- 5 かくして生成する本発明GPCRの活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明GPCRに対する抗体は、本発明GPCRを認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

- 10 本発明GPCRに対する抗体は、本発明GPCRを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

- 15 本発明GPCRは、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。
- 20

- モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができ
- 25
- ることができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプター蛋白質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁 (1975年)

〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

5 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

10 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプター蛋白質の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）また
15 はプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプター蛋白質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って
20 行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光
25 純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイ

ブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

5 モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

10 〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（本発明GPCR抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明GPCRに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

15 哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

20 また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

25 縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよ

い。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

- 5 抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

- 10 本発明GPCRのリガンドは β -アラニンまたはL-カルノシンである。L-カルノシンは β -アラニンにヒスチジンが結合したものである。 β -アラニンは抑制性神経伝達物質であるグリシンやGABAと構造が類似している。また、本発明GPCRは、小脳、脊髄後根神経節、膀胱、精巣、子宮などに特異的に発現している。したがって、本発明GPCRは中枢性や末梢性の神経系において、神経伝達の調節に関与していると考えられる。

- 15 従って、本発明GPCRをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明GPCRに対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、本発明のDNAに対するアンチセンスDNA（以下、本発明のアンチセンスDNAと略記する場合がある）は、以下の用途を有している。

（1）本発明GPCRの機能不全に関連する疾患の予防・治療剤

- 20 本発明GPCRは中枢または（および）末梢神経機能に関与すると考えられる。従って、a) 本発明GPCRまたはb) 本発明GPCRをコードするDNAを、中枢または末梢神経機能調節剤や、本発明GPCRの機能不全に関連する疾患、特に中枢または（および）末梢神経機能異常に関連する疾患の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。

- 25 例えば、生体内において本発明GPCRが減少しているために、リガンドである β -アラニンまたはL-カルノシンの生理作用が期待できない（本発明GPCRの欠乏症）患者がいる場合に、a) 本発明GPCRを該患者に投与し該GPCRの量を補充したり、b) （イ）本発明GPCRをコードするDNAを該患者

に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）対象となる細胞に本発明G P C RをコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内における該G P C Rの量を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。すなわち、本発明G P C RをコードするDNAは、安全で低毒性な該G P C Rの機能不全に関連する疾患、特に
5 中枢または（および）末梢神経機能異常に関連する疾患の予防・治療剤として有用である。

具体的には、本発明G P C Rまたは本発明のDNAは、例えば、抗不安薬、催眠鎮静薬、筋弛緩薬、麻酔増強薬、抗痙攣薬、抗依存症薬、抗精神分裂病薬、
10 抗てんかん薬、抗心身症薬などの中枢神経機能異常疾患予防・治療薬として、あるいは失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症などの末梢神経機能の異常に関連する疾患の予防・治療薬などとして使用することができる。さらに、本発明G P C Rまたは本発明のDNAは、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱
15 帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症（脊髄損傷、頭部外傷）、術後後遺症（脳・脊髄腫瘍を含むその他の脳性疾患、その他のミエロパチー）、疼痛、知覚過敏、しびれなどの疾患の予防・治療薬などとして使用することができる。

また、 β -アラニンまたはL-カルノシンは本発明G P C Rのシグナル伝達作用増強薬、中枢または末梢神経機能調節薬などとして、本発明G P C Rの機能不全に関連する疾患、特に中枢または（および）末梢神経機能異常に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として使用することができる。具
20 体的には、 β -アラニンまたはL-カルノシンは、抗不安薬、催眠鎮静薬、筋弛緩薬、麻酔増強薬、抗痙攣薬、抗依存症薬、抗精神分裂病薬、抗てんかん薬、
25 抗心身症薬などの中枢神経機能異常疾患予防・治療薬として、あるいは失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症などの末梢神経機能の異常に関連する疾患の予防・治療薬などとして使用することができる。さらに、 β -アラニンまたはL-カルノシンは、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、

瘻性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症（脊髄損傷、頭部外傷）、術後後遺症（脳・脊髄腫瘍を含むその他の脳性疾患、その他のミエロパチー）、疼痛、知覚過敏、しびれなどの疾患の予防・治療薬などとして使用することができる。

本発明GPCRを上記医薬として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明のDNAを上記医薬として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、a) 本発明GPCRまたはb) 本発明のDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、a) 本発明GPCRまたはb) 本発明のDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タ

イプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記医薬は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明GPCRの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、精神分裂病患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、精神分裂病患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当た

りに換算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、精神分裂病患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与
5 する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、精神分裂病患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈
10 注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量を投与することができる。

(2) 遺伝子診断剤

本発明のDNAおよびアンチセンスDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブ
15 タ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明GPCRまたはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

20 本発明のDNAまたはアンチセンスDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics）, 第5巻, 874～879頁（1989年）、プロシ
ージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the
25 United States of America）, 第86巻, 2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明GPCRの発現低下が検出された場合は、例えば、本発明GPCRの機能不全、特に中枢または（

および)末梢神経機能異常に関連する疾患に罹患している可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明G P C Rの発現過多が検出された場合は、例えば、本発明G P C Rの過剰発現に起因する疾患、特に

5 中枢または(および)末梢神経機能障害に罹患している可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

本発明G P C Rの機能不全に関連する疾患としては、例えば、不安症、不眠症、興奮症、筋萎縮症、麻酔抵抗性、痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症などの中枢神経機能異常疾患、あるいは失禁症、神経性高血圧、切迫流

10 産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症などの末梢神経機能異常疾患、さらには脳血管障害、脳性(小児)麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症(脊髄損傷、頭部外傷)、術後後遺症(脳・脊髄腫瘍を含むその他の脳性疾患、その他のミエロパチー)、疼痛、知覚過敏、しびれなどが挙げら

15 れる。

本発明G P C Rの過剰発現に起因する疾患としては、例えば、運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺などが挙げられる。

(3) 本発明G P C Rの発現量を変化させる化合物を含有する医薬

本発明のDNAは、プローブとして用いることにより、本発明G P C Rの発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

20

すなわち、本発明は、例えば、(i)非ヒト哺乳動物のa)血液、b)特定の臓器、c)臓器から単離した組織もしくは細胞、または(ii)形質転換体等に含まれる本発明G P C RのmRNA量を測定することによる、本発明G P C Rの

25 発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明G P C RのmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラ

ット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）
5 ）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。

得られた細胞に含まれる本発明G P C Rのm R N Aは、例えば、通常の方法により細胞等からm R N Aを抽出し、例えば、T a q M a n P C Rなどの手法を用いることにより定量することができ、自体公知の手段によりノーザンブロットを行うことにより解析することもできる。

- 10 (ii) 本発明G P C Rを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれる本発明G P C Rのm R N Aを同様にして定量、解析することができる。

本発明G P C Rの発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

- 15 (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日
20 後、より好ましくは1時間後～24時間後）、細胞に含まれる本発明G P C Rのm R N A量を定量、解析することにより行なうことができ、

- 25 (ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後）、該形質転換体に含まれる本発明G P C Rのm R N A量を定量、解析することにより行なうことができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、本発明G P C Rの発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）本発明G P C Rの発現量を増加させることにより、本発明G P C Rを介す

る細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、（ロ）本発明 GPCR の発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

10 本発明 GPCR のリガンドは、上記のとおり β -アラニンまたは L-カルノシンである。したがって、上記スクリーニング方法で得られる本発明 GPCR の発現量を変化させる化合物は、中枢または末梢神経機能調節薬剤や、本発明 GPCR の機能不全、特に中枢または（および）末梢神経機能異常に関連する疾患の予防・治療剤として用いることができる。

15 具体的には、本発明 GPCR の発現量を増加させ、細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明 GPCR の機能不全に関連する疾患に対する安全で低毒性な予防・治療薬として有用である。

本発明 GPCR の発現量を減少させ、細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明 GPCR の発現過多に起因する疾患に対する安全で低毒性な予防・治療薬として有用である。

20 本発明 GPCR の機能不全に関連する疾患としては、例えば、不安症、不眠症、興奮症、筋萎縮症、麻酔抵抗性、痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症などの中枢神経機能異常疾患、あるいは失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症などの末梢神経機能異常疾患、さらには脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症（脊髄損傷、頭部外傷）、術後後遺症（脳・脊髄腫瘍を含むその他の脳性疾患、その他のミエロパチー）、疼痛、知覚過敏、しびれなどが挙げら

れる。

本発明GPCRの過剰発現に起因する疾患としては、例えば、運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺などが挙げられる。

- 5 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

- 例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。
- 10

- 15 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソル
- 20
- 25

ベート 80TM、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

5 また、上記医薬は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

10 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、分裂病患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.1～100 mg、好ましくは約 15 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、分裂病患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注 20 射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60 kg 当たり に換算した量を投与することができる。

(4) 本発明 GPCR に対するリガンドの定量法および診断方法

本発明の抗体は、本発明 GPCR を特異的に認識することができるので、被検液中の該 GPCR の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用 25 することができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明 GPCR とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明 GPCR の割合を測定する

ことを特徴とする被検液中の該G P C Rの定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明G P C Rの定量法を提供する。

上記 (ii) の定量法においては、一方の抗体が本発明G P C RのN端部を認識する抗体で、他方の抗体が該G P C RのC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明G P C Rに対するモノクローナル抗体を用いて該G P C Rの定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')₂、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明G P C Rの定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、本発明G P C R量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[¹²⁵I]、[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチ

ン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常 GPCR あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明 GPCR 量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明 GPCR の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明 GPCR の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明 GPCR の C 端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくは C 端部以外、例えば N 端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原 (F) と、抗体と結合した標識抗原 (B) とを分離し (B/F 分離)、B、F いずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F 分離をポリエチレ

ングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

5 イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

10 また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

15 これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明G P C Rの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

20 例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal

Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明G P C Rを感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明G P C Rの濃度を定量することによって、該G P C Rの濃度の減少が検出された場合、例えば、該G P C Rの機能不全、特に中枢または（および）末梢神経機能異常に関連する疾患に罹患している可能性が高い、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明G P C Rの濃度の増加が検出された場合には、例えば、該G P C Rの過剰発現に起因する疾患に罹患している可能性が高い、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

本発明G P C Rの機能不全に関連する疾患としては、例えば、不安症、不眠症、興奮症、筋萎縮症、麻酔抵抗性、痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症などの中枢神経機能異常疾患、あるいは失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症などの末梢神経機能異常疾患、さらには脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症（脊髄損傷、頭部外傷）、術後後遺症（脳・脊髄腫瘍を含むその他の脳性疾患、その他のミエロパチー）、疼痛、知覚過敏、しびれなどが挙げられる。

本発明G P C Rの過剰発現に起因する疾患としては、例えば、運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺などが挙げられる。

(5) 本発明G P C Rに対するアゴニストのスクリーニング方法

β -アラニンまたはL-カルノシンが本発明G P C Rに結合することによって、細胞内c AMP生成の抑制が見られることから、本発明G P C Rはこの細胞内シグナルを指標として本発明G P C Rに対する β -またはL-カルノシン以外のアゴニスト（天然リガンドを含む）を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、試験化合物を本発明GPCRを含有する細胞に接触させた場合における、本発明GPCRを介した細胞内cAMP生成抑制活性を測定することを特徴とする本発明GPCRに対するアゴニストの決定方法を提供する。

- 5 試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP27、PACAP38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーテッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、GCP-2、PF4、IP-10、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、eotaxin、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、HCC-1、MIP-3 α /LARC、MIP-3 β /ELC、I-309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCケモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィンゴシン1-リン酸など）の他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清、低分子合成化合物などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清な
- 10
- 15
- 20
- 25

どを本発明GPCRに添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

具体的には、本発明のアゴニスト決定方法は、本発明の組換え型GPCRの発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによ

5 よって、本発明GPCRを介する細胞内cAMP生成抑制活性を有する化合物またはその塩を決定する方法である。

より具体的には、本発明は、次のような決定方法を提供する。

(1) 試験化合物を本発明GPCRを含有する細胞に接触させた場合における細胞内cAMP生成抑制活性を測定することを特徴とする本発明GPCRに対

10 するアゴニストの決定方法、および

(2) 試験化合物を本発明GPCRDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明GPCRに接触させた場合における本発明GPCRを介する細胞内cAMP生成抑制活性を測定することを特徴とする本発明GPCRに対するアゴニストの決定方法を提供する。

15 特に、試験化合物が本発明GPCRに結合することを確認した後に、上記の試験を行なうことが好ましい。

本発明のアゴニスト決定方法において、本発明GPCRを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行なうことができる。

20 本発明GPCRを含有する細胞の膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによ

25 る破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500~3000rpm) で短時間 (通常、約1~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000~30000rpm) で通常30分~2時間遠

心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した本発明GPCRと細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

本発明GPCRを含有する細胞やその細胞膜画分中の本発明GPCRの量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のアゴニスト決定方法を実施するためには、本発明GPCRを介する細胞内cAMP生成抑制活性を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明GPCRを含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。アゴニスト決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、cAMPなど）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP生成抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

本発明のアゴニスト決定用キットは、本発明GPCRを含有する細胞またはその細胞膜画分を含有するものである。

このようにして決定される本発明GPCRに対するアゴニストは、本発明GPCRに結合してその生理的機能を調節するので、中枢または末梢神経機能調節剤や本発明GPCRの機能に関連する疾患の予防・治療剤として用いることができる。具体的には、抗不安薬、催眠鎮静薬、筋弛緩薬、麻酔増強薬、あるいは痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症などの疾患に対する予防・治療薬として有用である。さらに、本発明GPCRに対するアゴニストは、脳血

管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症（脊髄損傷、頭部外傷）、術後後遺症（脳・脊髄腫瘍を含むその他の脳性疾患、その他のミエロパチー）、疼痛、知覚過敏、しびれなどの疾患の予防・治療薬などとして使用することができる。

（６）本発明GPCRとリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法、および本発明GPCRとリガンドとの結合性を変化させる化合物を含有する医薬

本発明GPCRを用いるか、または組換え型の該GPCR発現系を構築し、
該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドであるβ-アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、（イ）本発明GPCRを介して細胞刺激活性を有する化合物（いわゆる、本発明GPCRに対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明GPCRに対するアンタゴニスト）、（ハ）β-アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）β-アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合力を減少させる化合物などが含まれる。

すなわち、本発明は、（i）本発明GPCRとβ-アラニンまたはL-カルノシンとを接触させた場合と（ii）本発明GPCRとβ-アラニンまたはL-カルノシンおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするβ-アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、（i）と（ii）の場合における、例えば、本発明GPCRに対するβ-アラニンまたはL-カルノシンの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

細胞刺激活性としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、

細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性などが挙げられるが、なかでも cAMP 生成抑制活性などが好ましい。

5 より具体的には、本発明は、

a) 標識した β -アラニンまたは L-カルノシンを、本発明 GPCR に接触させた場合と、標識した β -アラニンまたは L-カルノシンおよび試験化合物を本発明 GPCR に接触させた場合における、標識した β -アラニンまたは L-カルノシンの該 GPCR に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする β -アラニンまたは L-カルノシンと該 GPCR との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

10 b) 標識した β -アラニンまたは L-カルノシンを、本発明 GPCR を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識した β -アラニンまたは L-カルノシンおよび試験化合物を本発明 GPCR を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した β -アラニンまたは L-カルノシンの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする β -アラニンまたは L-カルノシンと本発明 GPCR との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

15 c) 標識した β -アラニンまたは L-カルノシンを、本発明の DNA を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明 GPCR に接触させた場合と、標識した β -アラニンまたは L-カルノシンおよび試験化合物を本発明の DNA を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明 GPCR に接触させた場合における、標識した β -アラニンまたは L-カルノシンの該 GPCR に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする β -アラニンまたは L-カルノシンと該 GPCR との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

20 d) 本発明 GPCR を活性化する化合物（例えば、 β -アラニンまたは L-カルノシンなど）を本発明 GPCR を含有する細胞に接触させた場合と、本発明

GPCRを活性化する化合物および試験化合物を本発明GPCRを含有する細胞に接触させた場合における、本発明GPCRを介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと該GPCRとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

- 5 e) 本発明GPCRを活性化する化合物（例えば、 β -アラニンまたはL-カルノシンなど）を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明GPCRに接触させた場合と、本発明GPCRを活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明GPCRに接触させた場合における、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする β -アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 15 さらに、リガンドとしては、 β -アラニンまたはL-カルノシンに代えて、 β -アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合性を変化させる化合物またはその塩を用いることもできる。この β -アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合性を変化させる化合物またはその塩は、例えば、リガンドとして β -アラニンまたはL-カルノシンを用いて、後述する本発明のスクリーニング方法を実施することによって得ることができる。以下のスクリーニング方法においては、 β -アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合性を変化させる化合物またはその塩を含めて、単に β -アラニンまたはL-カルノシンと表記する。

20 本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

- 25 まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明GPCRとしては、上記した本発明GPCRを含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明GPCRを含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のTGR7などが適している。

本発明G P C Rを製造するには、上記の方法が用いられるが、本発明のD N Aを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明G P C RをコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; N P V) のポリヘドリンプロモーター、S V 4 0由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、S R α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267巻, 19555 ~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明G P C Rを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した本発明G P C Rであってもよいし、該G P C Rを含有する細胞を用いてもよく、また該G P C Rを含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明G P C Rを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明G P C Rを含有する細胞としては、該G P C Rを発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレス

などで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500～3000rpm）で短時間（通常、約1～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した本発明GPCRと細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

本発明GPCRを含有する細胞や膜画分中の該GPCRの量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

β -アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記のa)～c)を実施するためには、例えば、適当な本発明GPCR画分と、標識した β -アラニンまたはL-カルノシンが必要である。

本発明GPCR画分としては、天然型の本発明GPCR画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型該GPCR画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識した β -アラニンまたはL-カルノシンとしては、標識した β -アラニンまたはL-カルノシン、あるいは標識した β -アラニンアナログまたは標識したL-カルノシンなどが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識された β -アラニンまたはL-カルノシンなどが用いられる。

具体的には、 β -アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明GPCRを含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより該GPCR標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどの、

β -アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプター蛋白質やリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01~10mlの該レセプター蛋白質溶液に、一定量（5000~500000cpm）の標識した β -アラニンまたはL-カルノシンを添加し、同時に 10^{-4} ~ 10^{-10} Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の β -アラニンまたはL-カルノシンを加えた反応チューブも用意する。反応は約0~50℃、望ましくは約4~37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは γ -カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ B_0 ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ B_0 -NSB）を100%とした時、特異的結合量（ B -NSB）が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

β -アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記のd)~e)の方法を実施するためには、例えば、本発明GPCRを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など、特に細胞内cAMP生成抑制活性）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明GPCRを含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地ある

いは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明GPCRを発現した細胞が必要である。本発明GPCRを発現した細胞としては、天然型の本発明GPCRを有する細胞株、上記の組換え型の該GPCRを発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

また、試験化合物としては、本発明GPCRの活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置に基づいて、リガンド結合ポケットに結合するように設計された化合物が好ましく用いられる。本発明GPCRの活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置の測定は、公知の方法あるいはそれに準じる方法を用いて行うことができる。

β -アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合性を変化させる化合物がアゴニストかアンタゴニストであるかは、上記した本発明GPCRに対するアゴニストのスクリーニング方法を用いて確認することができる。

β -アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明GPCR、本発明GPCRを含有する細胞、または本発明GPCRを含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

a) 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

5 Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μm のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

b) 本発明GPCR標品

10 本発明GPCRを発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

c) 標識 β -アラニンまたはL-カルノシン

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識した β -アラニンまたはL-カルノシン

15 水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μM に希釈する。

d) β -アラニンまたはL-カルノシン標準液

β -アラニンまたはL-カルノシンを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

20 a) 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明GPCR発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μl の測定用緩衝液を各穴に加える。

25 b) $10^{-3} \sim 10^{-10}\text{M}$ の試験化合物溶液を5 μl 加えた後、標識 β -アラニンまたはL-カルノシンを5 μl 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3}M の β -アラニンまたはL-カルノシンを5 μl 加えておく。

c) 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチ

レーターA（和光純薬製）と混合する。

d) 液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding（PMB）を次の式で求める。

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

5 PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding（非特異的結合量）

B₀ : 最大結合量

10 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、β-アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介して細胞刺激活性を有する化合物（いわゆる、本発明GPCRに対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明GPCRに対するアンタゴニスト）、（ハ）β-アラニン
15 またはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）β-アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合力を減少させる化合物である。

20 該化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、中枢または末梢神経機能調節薬として有用である。

25 本発明GPCRに対するアゴニストは、本発明GPCRに対するリガンドであるβ-アラニンまたはL-カルノシンが有する生理活性と同様の作用を有しているため、β-アラニンまたはL-カルノシンが有する生理活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明GPCRに対するアンタゴニストは、本発明GPCRに対するリガンドであるβ-アラニンまたはL-カルノシンが有する生理活性を抑制すること

ができるので、 β -アラニンまたはL-カルノシンの生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

5 β -アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合力を増強する化合物は、本発明GPCRに対するリガンドである β -アラニンまたはL-カルノシンが有する生理活性を増強することができるので、 β -アラニンまたはL-カルノシンが有する生理活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

10 β -アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合力を減少させる化合物は、本発明GPCRに対するリガンドである β -アラニンまたはL-カルノシンが有する生理活性を減少させることができるので、 β -アラニンまたはL-カルノシンの生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

具体的には、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる①本発明GPCRに対するアゴニストまたは② β -アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合力を増強する化合物またはその塩は、例えば、抗不安薬、催眠鎮静薬、筋弛緩薬、麻酔増強薬、あるいは痙攣、
15 依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症などの疾患に対する予防・治療薬として有用である。さらに、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる①本発明GPCRに対するアゴニストまたは② β -アラ
20 ニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合力を増強する化合物またはその塩は、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症（脊髄損傷、頭部外傷）、術後後遺症（脳・脊髄腫瘍を含むその他の脳性疾患、その他のミエロパチー）、疼痛、知覚過敏、しびれなど
25 の疾患の予防・治療薬などとして使用することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる①本発明GPCRに対するアンタゴニストまたは② β -アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCRとの結合力を減少させる化合物またはその塩は、

例えば、運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺などの疾患に対する予防・治療薬として有用である。

5 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

10 例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

15 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、
25 例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソル

ベート 80TM、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

5 また、上記医薬は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

10 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

例えば、本発明GPCRに対するアゴニストの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、精神分裂病患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、精神分裂病患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(6) 各種薬物の作用メカニズムの解明方法

本発明GPCRを用いることによって、各種薬物が本発明GPCRを介して薬理効果を発揮しているか否かを確認することができる。

25 すなわち、本発明は、

(1)本発明GPCRを用いることを特徴とする、中枢もしくは末梢神経機能調節薬、または不安症、不眠症、興奮症、筋萎縮症、麻酔感受性、痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、

男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏、しびれ、運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難もしくは感覚麻痺の予防・治療薬が該レセプター蛋白質またはその塩に結合することを確認する方法、

(2)本発明GPCRを用いることを特徴とする、中枢もしくは末梢神経機能調節薬、または不安症、不眠症、興奮症、筋萎縮症、麻酔感受性、痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療薬が該レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストであることを確認する方法、

(3)本発明GPCRを用いることを特徴とする、中枢もしくは末梢神経機能調節薬、または運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症もしくは感覚麻痺の予防・治療薬が該レセプター蛋白質またはその塩に対するアンタゴニストであることを確認する方法、

(4)各薬を本発明GPCRに接触させた場合における、各薬と本発明GPCRとの結合量を測定することを特徴とする上記(1)～(3)記載のスクリーニング方法を提供する。

この確認方法は、前記したリガンドと本発明GPCRとの結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法において、試験化合物に代えて、上記の薬物を使用することによって実施することができる。

また、本発明の確認方法用キットは、前記したリガンドと本発明GPCRとの結合性を変化させる化合物のスクリーニング用キットにおいて、試験化合物に代えて、上記の薬物を含有するものである。

このように、本発明の確認方法を用いることによって、市販または開発途中

の各種薬物が本発明GPCRを介して薬理効果を発揮していることを確認することができる。

(7) 細胞膜における本発明GPCRまたはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する医薬

- 5 本発明の抗体は、本発明GPCRを特異的に認識することができるので、細胞膜における本発明GPCRの量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、

- 10 (i) 非ヒト哺乳動物のa) 血液、b) 特定の臓器、c) 臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明GPCRを定量することによる、細胞膜における本発明GPCRの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

- 15 (ii) 本発明GPCRを発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明GPCRを定量することによる、細胞膜における本発明GPCRの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

- 20 (iii) 非ヒト哺乳動物のa) 血液、b) 特定の臓器、c) 臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明GPCRの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

(iv) 本発明GPCRを発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明GPCRの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

- 25 細胞膜画分に含まれる本発明GPCRの定量は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラ

- ット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痲呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）
- 5 ）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤（例えば、トリトンX 100™、ツイーン20™など）などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。
- 10 細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠
- 15 心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500～3000 rpm）で短時間（通常、約1～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した本発明GPCRと細胞由来の
- 20 リン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

細胞膜画分に含まれる本発明GPCRは、例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウェスタンブロット解析などにより定量することができる。

- かかるサンドイッチ免疫測定法は上記の方法と同様にして行なうことができ、
- 25 ウェスタンブロットは自体公知の手段により行なうことができる。

(ii) 本発明GPCRを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれる本発明GPCRを定量することができる。

細胞膜における本発明GPCRの量を変化させる化合物のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、細胞膜における本発明GPCRの量を定量することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後）、細胞膜における本発明GPCRの量を定量することにより行なうことができる。

細胞膜画分に含まれる本発明GPCRの確認は具体的には以下のようにして行なう。

(iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜における本発明GPCRの量を確認することができる。

(iv) 本発明GPCRを発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞

膜における本発明GPCRの量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)細胞膜における本発明GPCRの量を増加させることにより、本発明GPCRを介する細胞刺激活性を増強させる化合物、(ロ)細胞膜における本発明GPCRの量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、中枢または末梢神経機能調節薬として有用である。

細胞膜における本発明GPCRの量を増加させることにより、細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明GPCRの機能不全に関連する疾患に対する安全で低毒性な予防・治療薬として有用である。

細胞膜における本発明GPCRの量を減少させることにより、細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明GPCRの発現過多に起因する疾患に対する安全で低毒性な予防・治療薬として有用である。

具体的には、本発明GPCRの量を増加する化合物またはその塩は、例えば、抗不安薬、催眠鎮静薬、筋弛緩薬、麻酔増強薬、あるいは痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症などの疾患に対する予防・治療薬として使用することができる。さらに、本発明GPCRの量を増加する化合物またはその塩は、脳血管障害、脳性(小児)麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症(脊髄損傷、頭部外傷)、術後後遺症(脳・脊髄腫瘍を含むその他の脳性疾患、その他のミエロパチー)、疼痛、知覚過敏、しびれなどの疾患の予防・治療薬などとして使用することができる。

本発明GPCRの量を減少させる化合物またはその塩は、例えば、運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥

大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺などの疾患に対する予防・治療薬として使用することができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

- 5 例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に
- 10 認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性
- 15 セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のため
- 20 の無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、
- 25 例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベ

ンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療薬は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

例えば、細胞膜における本発明GPCRの量を増加させる化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、精神分裂病患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、精神分裂病患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量を投与することができる。

(8) 本発明GPCRに対する抗体を含有してなる医薬

本発明GPCRに対する抗体の中和活性とは、該GPCRの関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有する場合は、該GPCRの関与するシグナル伝達、例えば、該GPCRを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下

などを促進する活性または抑制する活性など）を不活性化することができる。

したがって、本発明GPCRに対する中和抗体は、中枢または末梢神経機能調節薬や、該GPCRの過剰発現などに起因する疾患（例えば、運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺などの疾患）の予防・治療薬として用いることができる。

(9) 本発明のアンチセンスDNAを含有してなる医薬

本発明のアンチセンスDNAは、中枢または末梢神経機能調節薬や、本発明GPCRの過剰発現などに起因する疾患（例えば、運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺などの疾患）の予防・治療薬として用いることができる。

例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

(10) 本発明のDNA導入動物の作製

本発明は、外来性の本発明のDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

〔1〕 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、

〔2〕 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第〔1〕記載の動物、

〔３〕ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第〔２〕記載の動物、および
〔４〕本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、
5 本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその
始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生に
おける胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でか
つ一般に８細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェク
ション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DE
10 AEーデキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作
出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、
組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培
養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公
知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出す
15 ることもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イ
ヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なか
でも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的
短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、
20 C57BL／6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、B
DF₁系統、B6D2F₁系統、BALB／c系統、ICR系統など）またはラ
ット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、
上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

25 本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDN
Aではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例え
ば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基

への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明GPCRを発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明GPCRの機能を抑制するGPCRを発現させるDNAなどが用いられる。

- 5 本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する
- 10 各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。
- 15 ができる。

- 本発明GPCRの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸
- 20 菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

- 上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロ
- 25 モーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性蛋白質、グルタチオンS-オート

- ランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1, K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存蛋白質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン三リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎蛋白質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、
- 15 ヒトペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）のプロモーター、ヒトおよびニトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの

20 配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻

25 訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明GPCRの翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNA

ライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常な本発明GPCRの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明GPCRの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本
5 発明GPCRの機能亢進症や、本発明GPCRが関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明GPCRの増加症状を有することから、本発明GPCRに関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

- 10 一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。
- 15 受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その
- 20 胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

- 本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発
25 現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明GPCRの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明GPCRの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療

方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明G P C Rの機能不活性型不応症における本発明の異常G P C Rによる正常G P C Rの機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

- 5 また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明G P C Rの増加症状を有することから、本発明G P C Rの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- 10 ①組織培養のための細胞源としての使用、
②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現された本発明G P C Rを分析することによる、本発明G P C Rにより特異的に発現あるいは活性化する本発明G P C Rとの関連性についての解析、
- 15 ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
⑤本発明の変異G P C Rを単離精製およびその抗体作製などが考えられる。
- 20 さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明G P C Rの機能不活性型不応症などを含む、本発明G P C Rに関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明G P C Rに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。
- 25 また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどの蛋白質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明G P C R産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれ

らにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明G P C Rおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明G P C Rの機能不活性型不応症を含む、本発明G P C Rに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、
5 上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明G P C Rに関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(11) ノックアウト動物

- 10 本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- [1] 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
[2] 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ
15 遺伝子）を導入することにより不活性化された第[1]項記載の胚幹細胞、
[3] ネオマイシン耐性である第[1]項記載の胚幹細胞、
[4] 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第[1]項記載の胚幹細胞、
[5] ゲッ歯動物がマウスである第[4]項記載の胚幹細胞、
[6] 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
20 [7] 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第[6]項記載の非ヒト哺乳動物、
[8] 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第[6]項記載の非ヒト哺乳動物、
25 [9] ゲッ歯動物がマウスである第[8]項記載の非ヒト哺乳動物、および
[10] 第[7]項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明GPCRの活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明GPCRの発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コードンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本

発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知

- 5 ES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス(C57BL/6とDBA/2とのF₁)を用いて樹立したもの
- 10 なども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

- 15 また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

- また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減する
- 20 ためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

- ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、
- 25 培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染

染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

- 5 このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1～10000U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001～0.5%トリプシン/0.1～5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1～3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。
- 10
- 15

- ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明G
- 20
- 25
- PCRまたは本発明GPCRの細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明G P C Rのヘテロ発現不全個体であり、本発明G P C Rのヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明G P C Rのホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトラ

ンスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明GPCRにより誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明GPCRの生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

(11a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することの特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物

乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であつてもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の上記疾患症状が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上低下した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明GPCRの欠損や損傷などによって引き起こされる疾患（例えば、不安症、不眠症、興奮症、筋萎縮症、麻酔抵抗性、痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症などの疾患に対する予防・治療薬など）に対する安全で低毒性な治療・予防剤、中枢または末梢神経機能調節剤などの医薬として使用することができる。さらに、該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症（脊髄損傷、頭部外傷）、術後後遺症（脳・脊髄腫瘍を含むその他の脳性疾患、その他のミエロパチー）、疼痛、知覚過敏、しびれなどの疾患の予防・治療薬などとして使用することができる。

また、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基

- 5 （例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）と
10 の塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明GPCRとリガンドとの結合性を変化させる化合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。

- 15 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に例えば、精神分裂病患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1～10
20 0mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、精神分裂病患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01～
25 30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量を投与することができる。

（11b）本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

5 上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

10 試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

15 本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

20 例えば、本発明GPCRをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）で置換している場合、本来、本発明GPCRの発現する組織で、本発明GPCRの代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド（X-gal）のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明GPCRの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明GPCR欠損マウス
25 またはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察

すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター

5 活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭

10 化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、

15 中枢または末梢神経機能調節薬として有用である。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明GPCRの発現を促進し、該GPCRの機能を促進することができるので、例えば、本発明GPCRの機能不全に関連する疾患などの予防・治療薬などの医薬として有用である。

20 本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明GPCRの発現を阻害し、該GPCRの機能を阻害することができるので、例えば、本発明GPCRの発現過多に関連する疾患などの予防・治療薬などの医薬として有用である。

本発明GPCRの機能不全に関連する疾患としては、例えば、不安症、不眠

25 症、興奮症、筋萎縮症、麻痺抵抗性、痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、

外傷後遺症（脊髄損傷、頭部外傷）、術後後遺症（脳・脊髄腫瘍を含むその他の脳性疾患、その他のミエロパチー）、疼痛、知覚過敏、しびれなどが挙げられる。

5 本発明G P C Rの過剰発現に起因する疾患としては、例えば、運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺などが挙げられる。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

10 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明G P C Rまたはその塩とリガンドとの結合性を変化させる化合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

15 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に例えば、精神分裂病患者（体重60 k gとして）においては、一日につき約0.1～100 m g、好ましくは約1.0～50 m g、より好ましくは約1.0～20 m gである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによつても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、精神分裂病患者（体重60 k gとして）においては、一日につき約0.01～30 m g程度、好ましくは約0.1～20 m g程度、より好ましくは約0.1～10 m g程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60 k g当たり
20
25 に換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種

疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明G P C Rのプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのG P C Rを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明G P C Rそのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

10 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、I U P A C—I U B Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

15	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
20	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
25	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸

	S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
	G l y	: グリシン
	A l a	: アラニン
	V a l	: バリン
5	L e u	: ロイシン
	I l e	: イソロイシン
	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
10	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
15	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
20	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	*	: 終止コドンに対応する
	M e	: メチル基
25	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジノー 4 (R) -カルボキサミド基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	T o s	: p-トルエンスルフォニル
	CHO	: ホルミル
5	B z l	: ベンジル
	Cl ₂ B z l	: 2, 6-ジクロロベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
10	Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	B o c	: t-ブトキシカルボニル
	DNP	: ジニトロフェノール
	Tr t	: トリチル
	B u m	: t-ブトキシメチル
15	F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	H O O B t	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1, 2, 3-ベンゾトリアジン
	H O N B	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
20	D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

配列番号：1

本発明のラット由来 r C B 7 T 0 8 4 をコードする c D N A の塩基配列を示す。

25 配列番号：2

本発明のラット由来 r C B 7 T 0 8 4 のアミノ酸配列を示す。

配列番号：3

本発明のヒト由来 T G R 7 をコードする c D N A の塩基配列を示す。

配列番号：4

本発明のヒト由来TGR7のアミノ酸配列を示す。

配列番号：5

実施例2で用いたTGR7用プライマーの塩基配列を表す。

5 配列番号：6

実施例2で用いたTGR7用プライマーの塩基配列を表す。

配列番号：7

実施例2で用いたTGR7用プローブの塩基配列を表す。

配列番号：8

10 実施例2で用いたrCB7T084用プライマーの塩基配列を表す。

配列番号：9

実施例2で用いたrCB7T084用プライマーの塩基配列を表す。

配列番号：10

実施例2で用いたrCB7T084用プローブの塩基配列を表す。

15

実施例

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

20 実施例1 rCB7T084およびTGR7に対する β -アラニンの反応性の確認

CHO-K1細胞株は、特に記載が無い限り10% 牛胎児血清 (Invitrogen) を含むハムF-12培地 (Invitrogen) を用いて培養した。トランスフェクションを行う前日に10cm²あたり4.5x10⁵個の細胞を播き、5% CO₂濃度に調整されたCO₂培養器にて37℃で15時間以上培養した。トランスフェクションはLipofectamine試薬 (Invitrogen) を用い、試薬添付の方法に準じて操作を行った。培養器に6-wellプレートを使用する場合は、以下のように行った。まず、1.5ml容チューブを2本用意し、それぞれにOpti-MEM培地 (Invitrogen) を100 μ l分注した。次に、

25

片方のチューブに発現ベクターを $1\mu\text{g}$ 、もう片方にLipofectamine試薬を $6\mu\text{l}$ 添加後、両者を混合し、20分間室温に静置した。この溶液にOpti-MEM培地を $800\mu\text{l}$ 加えたトランスフェクション用混合液を、あらかじめOpti-MEM培地を用いて洗浄したCHO-K1細胞に添加後、 CO_2 培養器にて6時間培養した。培養後の細胞は、

5 PBS (Invitrogen) を用いてリンスした後、0.05% トリプシン・EDTA溶液 (Invitrogen) を用いて剥がし、遠心操作にて回収した。得られた細胞の数を測定し、培地 $200\mu\text{l}$ あたり 5×10^4 個の細胞が含まれるように希釈し、Black walled 96-well plate (Costar) に1穴あたり $200\mu\text{l}$ ずつ分注後、 CO_2 培養器にて一晚培養した。上記トランスフェクション操作にて一過性に受容体を発現したCHO-K1

10 細胞に各種試験サンプルを添加し、この際の細胞内カルシウム濃度の変動をFLIPR (Molecular Device) を用いて測定した。FLIPRにて細胞内カルシウム濃度の変動を測定するために、以下の前処置を施した。まず、細胞に蛍光色素 Fluo-3AM (DOJIN) を添加するため、あるいはFLIPRアッセイを行う直前に細胞を洗浄するためのアッセイバッファーを作成した。HBSS (Invitrogen) 1000ml

15 に 1M HEPES (pH7.4) (DOJIN) 20ml を加えた溶液(以下、HBSS/HEPES溶液)に、プロベネシド(Sigma) 710mg を 1N NaOH 5ml に溶解後さらにHBSS/HEPES溶液 5ml を加え混合した溶液 10ml を添加し、この溶液をアッセイバッファーとした。次に Fluo-3AM $50\mu\text{g}$ を $21\mu\text{l}$ DMSO (DOJIN) に溶解し、さらに等量の20% プルロン酸 (Molecular Device) を加え混合後、 $105\mu\text{l}$ の牛胎児血清を添加した 10.6ml の

20 アッセイバッファーに加え、蛍光色素溶液を調製した。トランスフェクション処理を施したCHO-K1細胞の培地を除き、直ちに蛍光色素溶液を1穴あたり $100\mu\text{l}$ ずつ分注後、 CO_2 培養器にて1時間培養し、細胞に蛍光色素を取り込ませた。培養後の細胞は上記のアッセイバッファーを用いて洗浄した後、FLIPRにセットした。

25 。また、受容体発現CHO-K1細胞に添加する試験サンプルはアッセイバッファーを用いて調製し、同時にFLIPRにセットした。以上の前処置を施した後、FLIPRにて各種試験サンプル添加後の細胞内カルシウム濃度の変動を測定した結果、 β -アラニンを 10^{-4}M ~ 10^{-5}M 加えたときに、ラットrCB7T084 (図2) およびそのヒト型のTGR7 (図1) を発現するCHO-K1細胞が特異的に応答(細胞内カルシウム

濃度の上昇)することを発見した。コントロールの発現ベクターのみを導入したCHO-K1細胞(図3)では、このような応答は見られなかった。すなわち、rCB7T084およびそのヒト型のTGR7のリガンドが β -アラニンであることが判明した。

5 参考例1 rCB7T084およびTGR7の発現ベクターの構築

rCB7T084およびTGR7をコードするDNA断片はそれぞれ、WO 2000/205801およびWO 2001/83748に記載の方法に従ってクローンし、得られたDNA断片をpAKKO-111ベクターのSalI部位とSpeI部位に導入し、それぞれの発現ベクターを構築した。

10 実施例2 RT-PCRによるTGR7 mRNAのヒトにおける組織分布の検討

鋳型となるcDNAには、ヒト各種組織由来のpolyA+RNA(クロンテック社)から以下の方法で合成したものを使用した。RNA 1 μ gからランダムプライマー、逆転写酵素としてSuperScript II逆転写酵素(GIBCO BRL社)を用い、添付のマニュアルに従って42°Cで反応を行い、反応終了後にエタノール沈殿して100 μ lに溶解した。RT-PCRはSequence Detection System Prism 7700(PE Biosystems社)を用い、増幅と検出のためのプライマーとして5'-GGCTTTCGAATGCACAGGAA-3'(配列番号:5), 5'-CGTGGAAGCCATGCTGAAG-3'(配列番号:6)およびTaqMan probeとして5'-(Fam)-TTCTGCACTCTATATCCTCAACCTGGCGG-(Tamra)-3'(配列番号:7)を使用した。RT-PCR反応液はTaqMan Universal PCR Master Mix(PE Biosystems社) 12.5 μ lに、それぞれ100 μ Mのプライマー溶液を0.05 μ l、5 μ MのTaqMan probeを0.5 μ l、および上記で調製したcDNA溶液を0.5 μ l加え、蒸留水で総反応液量を25 μ lとした。PCR反応は50°C・2分、95°C・10分の後、95°C・15秒、60°C・1分のサイクルを4

0回繰り返した。得られたヒト各種組織におけるTGR 7のmRNA発現量はtotal RNA 25 ngあたりのコピー数として算出した(図4)。

実施例3 RT-PCRによるrCB 7 T 0 8 4 mRNAのラットにおける組織分布の検討

- 5 鋳型となるcDNAには、ラット各種組織由来のpoly A+RNAから以下の方法で合成したものを使用した。RNA 1 μ gからランダムプライマー、逆転写酵素としてSuperScript II逆転写酵素(GIBCO BRL社)を用い、添付のマニュアルに従って42°Cで反応を行い、反応終了後にエタノール沈殿して100 μ lに溶解した。RT-PCRはSequence
- 10 Detection System Prism 7700 (PE Biosystems社)を用い、増幅と検出のためのプライマーとして5' -TGA TGA ACTTCCTGGCTTCTTTC-3' (配列番号: 8), 5' -TGTCCACCTTGAAGCACTGGTA-3' (配列番号: 9) およびTaqMan probeとして5' - (Fam) CTGTGTTCAAT
- 15 TCTGGCATCCCGACAA- (Tamra) -3' (配列番号: 10) を使用した。RT-PCR反応液はTaqMan Universal PCR Master Mix (PE Biosystems社) 12.5 μ lに、それぞれ100 μ Mのプライマー溶液を0.05 μ l、5 μ MのTaqMan probeを0.5 μ l、および上記で調製したcDNA溶液を0.5
- 20 μ l加え、蒸留水で総反応液量を25 μ lとした。PCR反応は50°C・2分、95°C・10分の後、95°C・15秒、60°C・1分のサイクルを40回繰り返した。得られたラット各種組織におけるrCB 7 T 0 4 8のmRNA発現量はtotal RNA 25 ngあたりのコピー数として算出した(図5)。
- 実施例4 TGR 7およびrCB 7 T 0 8 4を発現させたCHO細胞における、
- 25 ホルスコリン添加によって増加させた細胞内cAMP量の β -アラニンおよびL-カルノシンによる抑制作用

TGR 7およびrCB 7 T 0 8 4を発現させたCHO細胞をアッセイ用培地(HBSS (GibcoBRL) に0.1%ウシ血清アルブミンおよび0.2mM IB

MXを添加したもの)にて洗浄した後、37℃、5%CO₂条件下で30分培養した。アッセイ用培地にて希釈した各濃度のβ-アラニン(1.0×10⁻³M~3.0×10⁻⁷M)およびL-カルノシン(1.0×10⁻³M~3.0×10⁻⁷M)を添加し、その後ホルスコリン1μMとなるように添加した。37℃、5%CO₂条件下で30分培養した。培養上清を捨てて、cAMP screen kit (アプライドバイオシステムズ社)のプロトコールに従い、細胞内のcAMP量をプレートリーダー(ARVO s xマルチラベルカウンター、Wallac社)を用いて測定した。

その結果、ベクターのみを導入したCHO細胞(mock)に比べ、TGR7およびrCB7T084遺伝子を導入したCHO細胞特異的に、ホルスコリン添加によって増加させた細胞内cAMP量のβ-アラニン(図6)およびL-カルノシン(図7)による用量依存的かつ特異的な減少が検出された。この活性を追うことにより、内因性リガンドの精製が可能であると考えられた。

実施例5 TGR7に対するアゴニストおよびアンタゴニストのスクリーニング方法の設定

(1) 細胞内カルシウム濃度変化を指標としたTGR7に対するアゴニストおよびアンタゴニストのスクリーニング方法の設定

TGR7に対するアゴニストおよびアンタゴニストの探索を行うための系を以下の方法で設定した。

参考例1で作製したヒトTGR7発現ベクターを用いて自体公知の方法で作製したヒトTGR7を発現させたCHO細胞株(CHO-hTGR7)を3×10⁴個/100μlの細胞が含まれるように希釈し、Black wall d 96-well plate (Costar)に1穴あたり100μlずつ分注後、CO₂培養器にて一晩培養した。細胞内カルシウム濃度の変動をFLIPR (Molecular Device)を用いて測定した。方法を以下に記載した。

Fluo-3AM (DOJIN) 50μgを21μl DMSO (DOJIN)に溶解し、さらに等量の20%プルロン酸(Molecular Pro

b e s) を加え混合後、 $105\mu\text{l}$ の牛胎児血清を添加した 10.6ml のアッセイバッファー [HBSS (Invitrogen) に 1M HEPES ($\text{pH}7.4$) (DOJIN) を 20ml 添加し、プロベネシド (Sigma) 710mg を 1N NaOH 5ml に溶解後さらに上記の HBSS/HEPES 溶液 5ml を加え混合した溶液 10ml を添加し調製する。] に加え、
5 蛍光色素溶液を調製した。細胞プレートの培地を除き、直ちに蛍光色素溶液を 1 穴あたり $100\mu\text{l}$ ずつ分注後、 CO_2 培養器にて 37°C で 1 時間培養し、細胞に蛍光色素を取り込ませた。培養後の細胞は上記のアッセイバッファーを用いて洗浄した。細胞に添加する被検体化合物はアッセイバッファーを用いて各々の濃度に希釈し、プレートに分注した。アンタゴニスト測定用に $90\mu\text{M}$ β -アラニン溶液 (反応時の終濃度で $30\mu\text{M}$) を別のプレートに分注し、同時に FLIPR にセットした。以上の前処置を施した後、FLIPR にて被検体化合物添加後の細胞内カルシウム濃度の変動を測定しアゴニスト作用を、続いて β -アラニンを添加してアンタゴニスト作用の測定を行った。被検体化合物がア
10 ゴニストであれば、細胞内カルシウム濃度の上昇が起こり、被検体化合物がアンタゴニストであれば、後で加える β -アラニンの反応を抑制する活性が観測される。被検体化合物添加後の蛍光強度値の変化を用いた用量反応曲線より、 EC_{50} 値を算出した。

(2) FLIPR アッセイの結果からアゴニスト候補を選択する基準

20 アゴニスト候補を選出するための被検体化合物は、予めその濃度が 10mM となるように DMSO (Wako) で希釈し、測定時に上記のアッセイバッファーで希釈して使用した。そして、それらの被検体化合物を用いて上記と同様の方法で、ヒト TGR7 を発現させた CHO 細胞株 (CHO-hTGR7) およびヒトヒスタミン H1 受容体発現ベクターを用いて自体公知の方法で作製したヒトヒスタミン H1 受容体を発現させた CHO 細胞株 (CHO-H1) に対
25 する反応開始 30 秒もしくは 40 秒後の蛍光強度値を測定した。さらに、 $100\mu\text{M}$ β -アラニンの CHO-hTGR7 に対する蛍光強度を 100% としたときの相対値を算出し、その値が CHO-hTGR7 に対し 50 もしくは 1

00%以上であり、かつCHO-H1に対する値が25%以下を満たす被検体化合物をヒトTGR7特異的アゴニスト候補とした。

(3) FLIPRアッセイの結果からアンタゴニスト候補を選択する基準

アンタゴニスト候補を選出するための被検体化合物は、予めその濃度が10
5 mMとなるようにDMSO (Wako) で希釈し、測定時に上記のアッセイバッファで希釈して使用した。そしてそれらの被検体化合物を用いて、上述したアゴニスト活性の測定後に引き続いて、ヒトTGR7を発現させたCHO細胞株 (CHO-hTGR7) およびヒトヒスタミンH1受容体を発現させたCHO細胞株 (CHO-H1) に対するアンタゴニスト活性を測定した。アンタ
10 ゴニスト評価のためには反応開始200秒後に、アゴニスト (CHO-hTGR7 に対しては30 μ M β -アラニン、CHO-H1 に対しては10 nMヒスタミン) を加え、反応開始230秒の蛍光強度値を測定した。被検体化合物がない場合のアゴニストによる蛍光強度を100%とし、被検体化合物がある場合の蛍光強度の相対値を算出し、その値がCHO-hTGR7 に対し50%以下
15 であり、かつCHO-H1 に対し80%以上を満たす被検体化合物をヒトTGR7 特異的アンタゴニスト候補とした。反応開始230秒後の蛍光強度値の変化を用いた用量反応曲線より、 IC_{50} 値を算出した。

実施例6 rCB7T084のラット後根神経節における発現解析

rCB7T084の神経節での発現量を調べるために、Wister rat
20 t (8週齢、オス) の後根神経節と脊髄のトータルRNAよりcDNAを調製し、実施例3の方法に従ってTaqManにより定量を行った (図8)。rCB7T084は後根神経節において脊髄と比較して390倍の高い発現が認められ、後根神経節に特異的に高発現していることが確認された。後根神経節は末梢からの全ての感覚情報の通過点であることから、rCB7T084が、触
25 覚、圧覚、温覚、冷覚、痛覚、運動感覚、深部痛などの感覚情報の伝達に関与しているものと考えられる。

産業上の利用可能性

本発明GPCR、その部分ペプチドまたはその塩、または本発明GPCRもしくはその部分ペプチドをコードするDNAは、精神分裂病などの中枢または（および）末梢神経機能異常に関与する疾患の予防・治療薬として有用である。

- 5 本発明GPCR、その部分ペプチドまたはその塩とリガンドである β -アラニンまたはL-カルノシンとを用いることによって、 β -アラニンまたはL-カルノシンと本発明GPCR、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物を効率良くスクリーニングすることができる。

請求の範囲

1. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる中枢または末梢神経機能調節剤。
2. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる抗不安剤、催眠鎮静剤、筋弛緩剤、麻酔増強剤、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療剤。
3. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる中枢または末梢神経機能調節剤。
4. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる抗不安剤、催眠鎮静剤、筋弛緩剤、麻酔増強剤、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療剤。
5. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは

実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる中枢または末梢神経機能異常の診断剤。

6. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは
- 5 実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる不安症、不眠症、興奮症、筋萎縮症、麻酔感受性、痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏、しびれ、運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難または感覚麻痺の診断剤。
- 10

7. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは
- 15 実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる中枢または末梢神経機能調節剤。

8. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは
- 20 実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺の予防・治療剤。

9. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは
- 25 実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドを含有してなる中枢または末梢神経機能調節剤。

10. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは

は実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドを含有してなる運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、
5 排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺の予防・治療剤。

1 1. (1) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) β -アラニンまたはL-カルノシンを用いることを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩と β -アラニンまたはL-カルノシンとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
10

1 2. (1) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) β -アラニンまたはL-カルノシンを含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩と β -アラニンまたはL-カルノシンとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
15

1 3. 請求項1 1記載のスクリーニング方法または請求項1 2記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、 β -アラニンまたはL-カルノシンと配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。
20

1 4. (1) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) 該レセプター蛋白質またはその塩と β -アラニンまたはL-カルノシンとの結合性を変化させる化合物またはその塩を用いることを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。
25

15. (1) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) 該レセプター蛋白質またはその塩と β -アラニンまたはL-カルノシンとの結合性を变化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用キット。

16. β -アラニンまたはL-カルノシンと配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

17. 中枢または末梢神経機能調節剤である請求項16記載の医薬。

18. (1) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) β -アラニンをを用いることを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩と β -アラニンとの結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

19. (1) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) β -アラニンを含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩と β -アラニンとの結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

20. 請求項18記載のスクリーニング方法または請求項19記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、 β -アラニンと配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩。

21. (1) 配列番号：2または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター

蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および（２）該レセプター蛋白質またはその塩とβ-アラニンとの結合性を変化させる化合物またはその塩を用いることを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。

- 5 22. （１）配列番号：２または配列番号：４で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および（２）該レセプター蛋白質またはその塩とβ-アラニンとの結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストまたは
- 10 はアンタゴニストのスクリーニング用キット。

23. β-アラニンと配列番号：２または配列番号：４で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

- 15 24. 中枢または末梢神経機能調節剤である請求項16記載の医薬。

- 25 25. 配列番号：２または配列番号：４で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストを含有してなる抗不安剤、催眠鎮静剤、筋弛緩剤、麻酔増強剤、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療剤。

26. 配列番号：２または配列番号：４で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアンタゴニストを含有してなる運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺の予防・治療剤。

27. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、当該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させ、中枢または末梢神経機能を調節する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

28. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる、当該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させ、中枢または末梢神経機能を調節する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

29. 請求項27記載のスクリーニング方法または請求項28記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させ、中枢または末梢神経機能を調節する作用を有する化合物またはその塩。

30. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる中枢または末梢神経機能調節剤。

31. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を増加させる化合物またはその塩を含有してなる抗不安剤、催眠鎮静剤、筋弛緩剤、麻酔増強剤、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化

症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療剤。

32. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を減少させる化合物またはその塩を含有してなる運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺の予防・治療剤。

33. 試験化合物を配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における細胞内cAMP生成抑制活性を測定することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストのスクリーニング方法。

34. β -アラニンまたはL-カルノシンを含有してなる配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達作用増強剤。

35. 中枢または末梢神経機能調節剤である請求項34記載の剤。

36. 抗不安剤、催眠鎮静剤、筋弛緩剤、麻酔増強剤、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療剤である請求項34記載の剤。

37. β -アラニンを含有してなる配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達作用増強剤。

38. 中枢または末梢神経機能調節剤である請求項37記載の剤。

39. 抗不安剤、催眠鎮静剤、筋弛緩剤、麻酔増強剤、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、

男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療剤である請求項 37 記載の剤。

- 5 40. 哺乳動物に対して、①配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩、②配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、または③配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアゴニストの有効量を投与することを特徴とする抗不安方法、催眠鎮静方法、筋弛緩方法、麻酔増強方法、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療方法。
- 10 41. 哺乳動物に対して、①配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、②配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド、または③配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するアンタゴニストの有効量を投与することを特徴とする運動機能失調症、
- 15
- 20
- 25

麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺の予防・治療方法。

- 4 2. 抗不安剤、催眠鎮静剤、筋弛緩剤、麻酔増強剤、または痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、
- 5 男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏もしくはしびれの予防・治療剤を製造するための①配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG
- 10 蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩、②配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、または③配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する
- 15 アゴニストの使用。

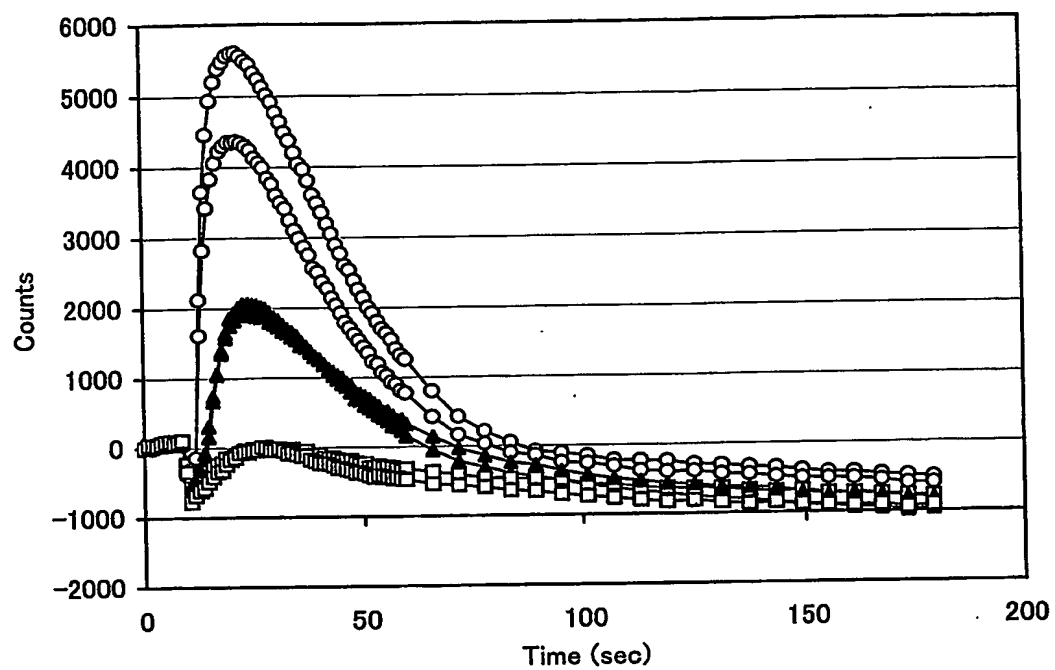
- 4 3. 運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難、依存症または感覚麻痺の予防・治療剤を製造するための①配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、②配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列または
- 20 その一部を含有してなるポリヌクレオチド、または③配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するアンタゴニストの使用。

4 4. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは

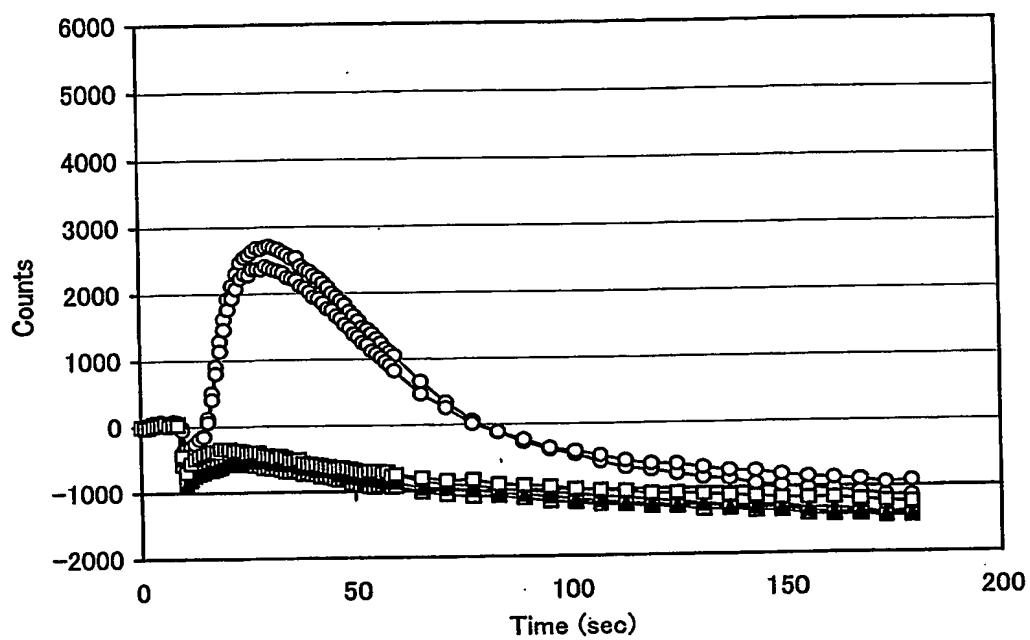
は実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる中枢または末梢神経機能異常の診断剤。

45. 配列番号：2または配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは
- 5 は実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる不安症、不眠症、興奮症、筋萎縮症、麻酔感受性、痙攣、依存症、精神分裂病、てんかん、心身症、失禁症、神経性高血圧、切迫流産、切迫早産、男性不妊、自律神経失調症、脳血管障害、脳性（小児）麻痺、痙性脊髄麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、後縦靱帯骨化症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、
- 10 外傷後遺症、術後後遺症、疼痛、知覚過敏、しびれ、運動機能失調症、麻痺、うつ病、覚醒遅延、記憶学習障害、低血圧、排尿困難、膀胱肥大、呼吸困難または感覚麻痺の診断剤。

図 1



2



☒ 3

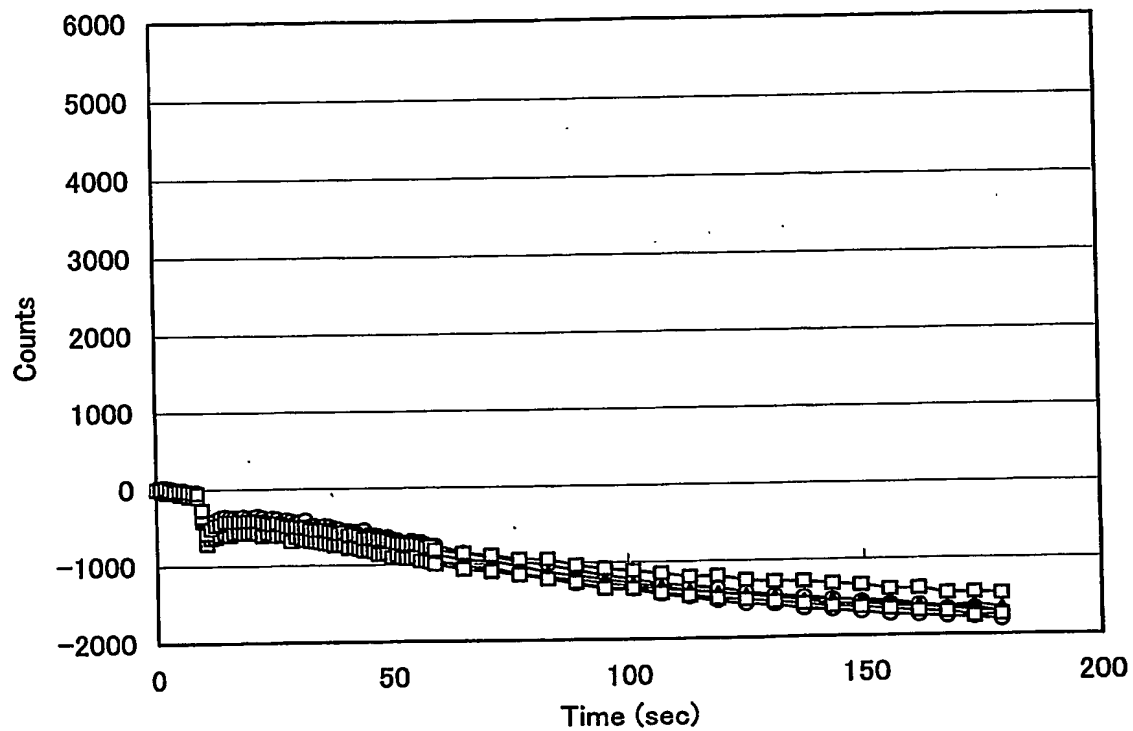


図 4

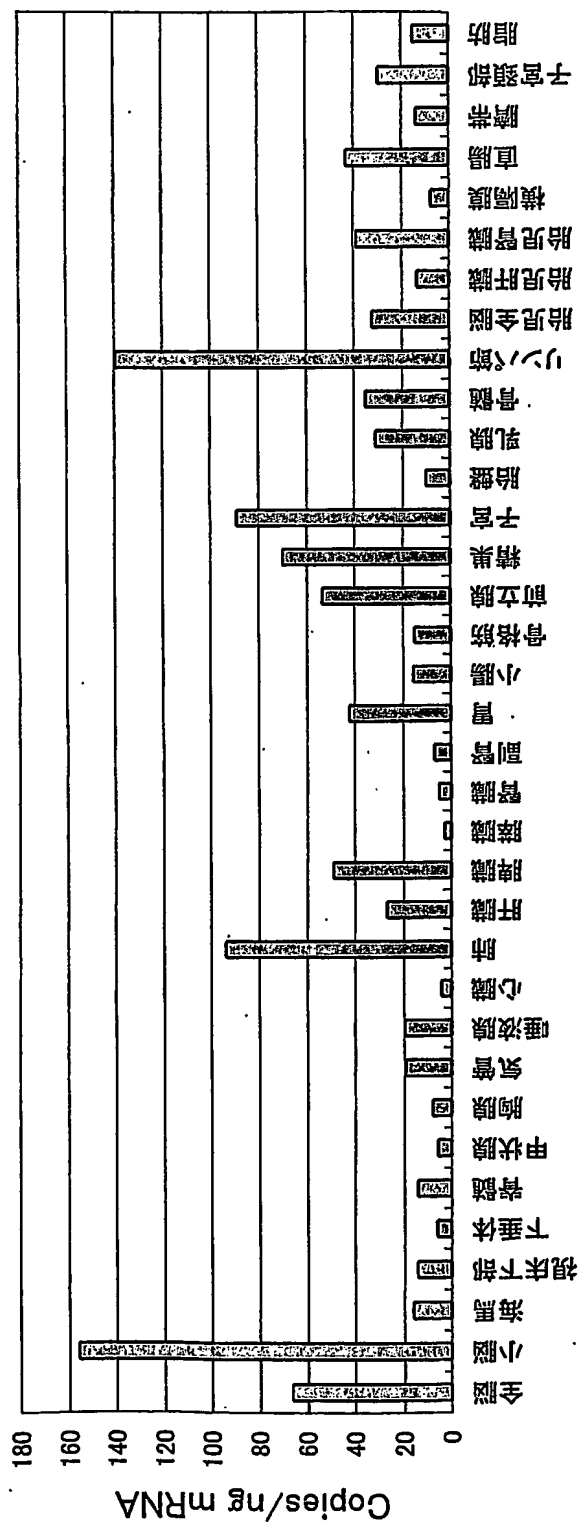
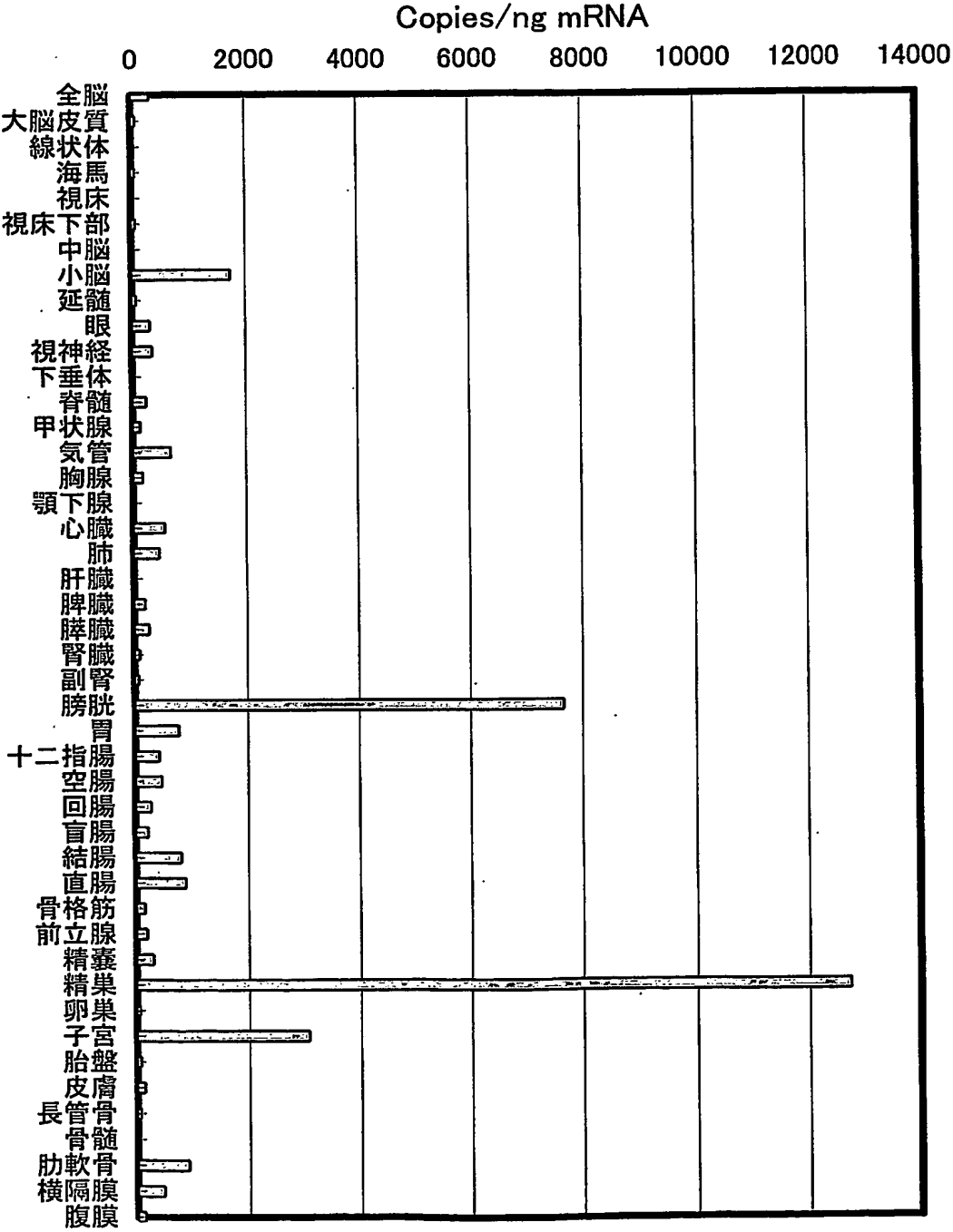
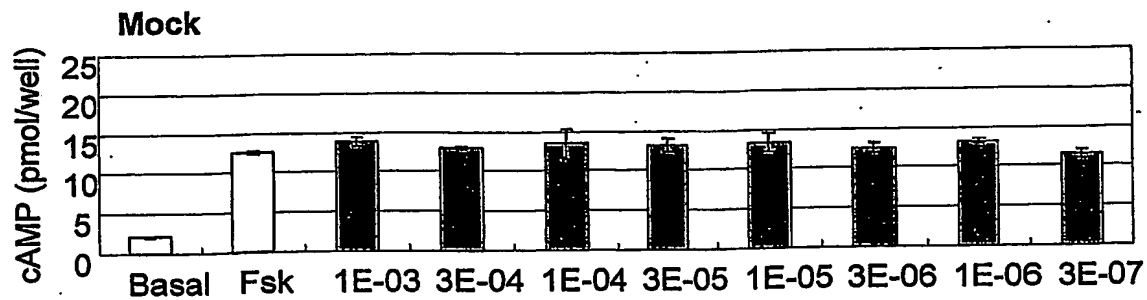
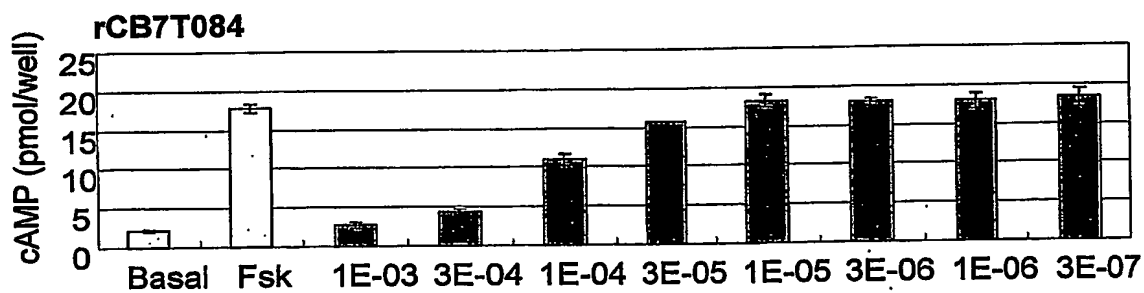
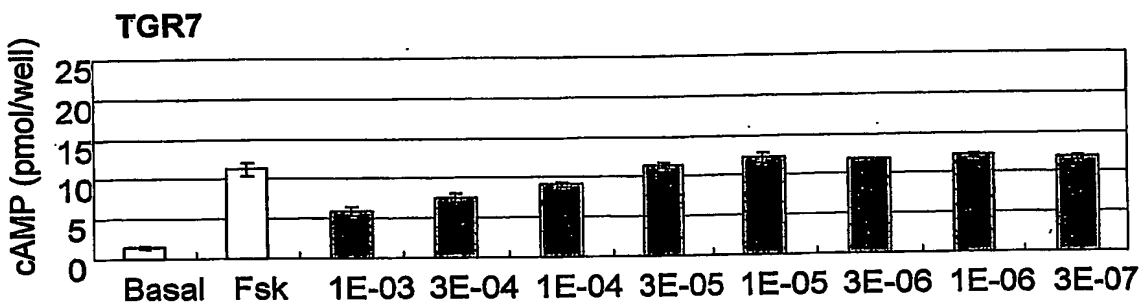


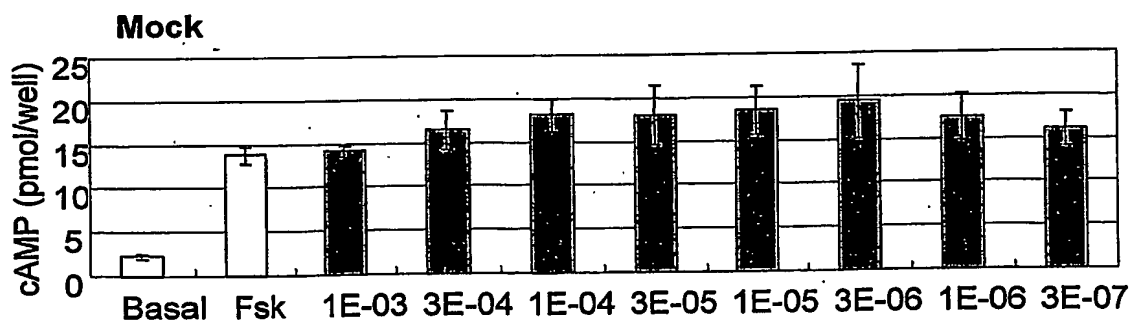
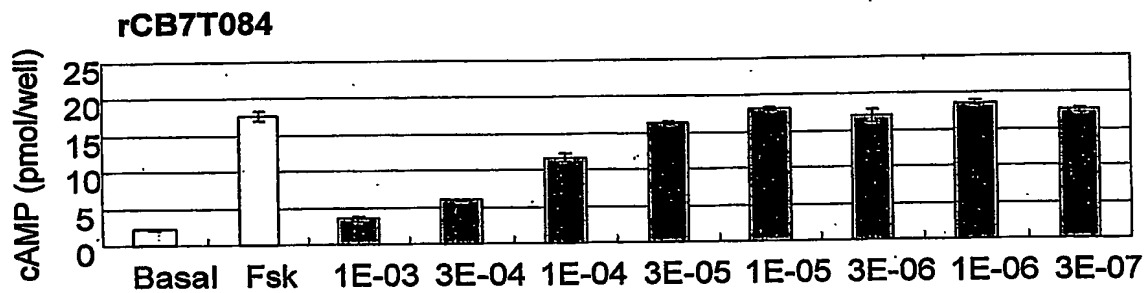
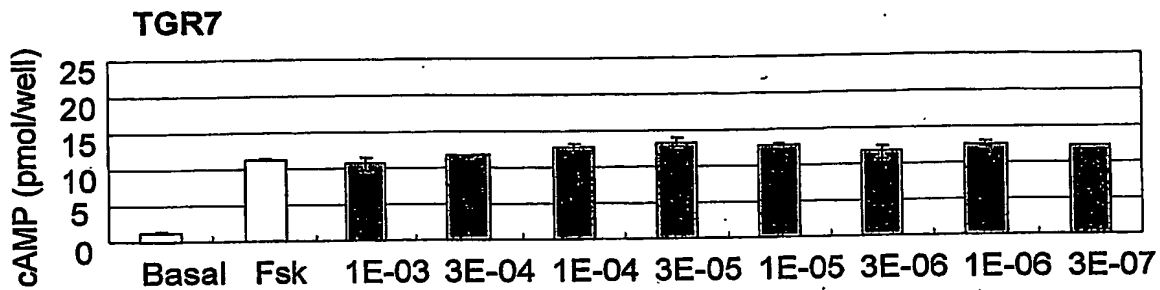
図 5

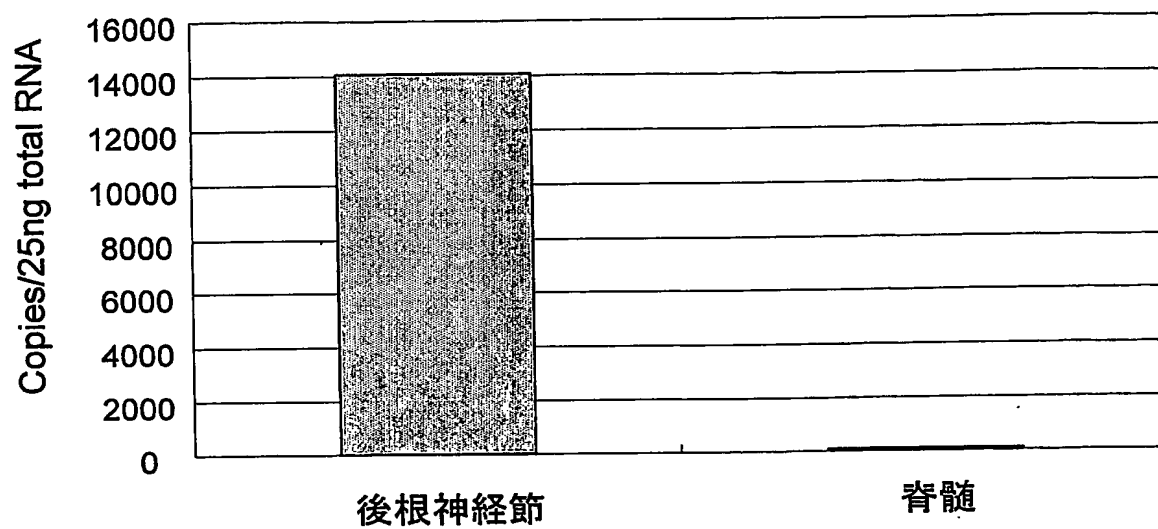


6



7



 8

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Screening Method

<130> 3037W00P

<150> JP 2002-093045

<151> 2002-03-28

<150> JP 2002-361580

<151> 2002-12-13

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 957

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (957)

<223>

<400> 1

atg aac tac act cct tat agc agc cca gcc cca ggt ctg acc atc agc 48

Met Asn Tyr Thr Pro Tyr Ser Ser Pro Ala Pro Gly Leu Thr Ile Ser

1 5 10 15

ccc acc atg gac cct gtg acc tgg gtt tac ttt tca gtg aca ttc ctg 96

Pro Thr Met Asp Pro Val Thr Trp Val Tyr Phe Ser Val Thr Phe Leu

20 25 30

gcc atg gcc acc tgt gtg tgt ggg ata gtg ggc aac tcc atg gtg att 144

Ala Met Ala Thr Cys Val Cys Gly Ile Val Gly Asn Ser Met Val Ile

35	40	45	
tgg cta ctg agt ttc cac agt gtg cag agg tcc ccc ttc tgc acc tac			192
Trp Leu Leu Ser Phe His Ser Val Gln Arg Ser Pro Phe Cys Thr Tyr			
50	55	60	
gtg ctc aac ctg gcg gtg gcc gac ctc ctc ttc ctg ctc tgc atg gcc			240
Val Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Phe Leu Leu Cys Met Ala			
65	70	75	80
tcc ctg ctc agt ctg gaa aca ggg ccc ctg ctc aca gcc agc acc tcc			288
Ser Leu Leu Ser Leu Glu Thr Gly Pro Leu Leu Thr Ala Ser Thr Ser			
85	90	95	
gcc aga gtc tac gag ggg atg aag aga atc aag tac ttt gcc tac aca			336
Ala Arg Val Tyr Glu Gly Met Lys Arg Ile Lys Tyr Phe Ala Tyr Thr			
100	105	110	
gca ggc ctg agc ctg ctg acg gcc atc agc acc cag cgc tgt ctc tcc			384
Ala Gly Leu Ser Leu Leu Thr Ala Ile Ser Thr Gln Arg Cys Leu Ser			
115	120	125	
gtg ctt ttc ccc atc tgg tat aag tgc cac cgg ccc cag cac ctg tcg			432
Val Leu Phe Pro Ile Trp Tyr Lys Cys His Arg Pro Gln His Leu Ser			
130	135	140	
ggg gtg gta tgt ggt gtg ctg tgg gca ctg gcc ctc ctg atg aac ttc			480
Gly Val Val Cys Gly Val Leu Trp Ala Leu Ala Leu Leu Met Asn Phe			
145	150	155	160
ctg gct tct ttc ttc tgt gtt caa ttc tgg cat ccc gac aaa tac cag			528
Leu Ala Ser Phe Phe Cys Val Gln Phe Trp His Pro Asp Lys Tyr Gln			
165	170	175	
tgc ttc aag gtg gac atg gtt ttc aac agt ctt atc ctg ggg atc ttc			576
Cys Phe Lys Val Asp Met Val Phe Asn Ser Leu Ile Leu Gly Ile Phe			

180	185	190	
atg ccc gtc atg gtc ctg acc agc gcc atc atc ttc atc cgc atg cga			624
Met Pro Val Met Val Leu Thr Ser Ala Ile Ile Phe Ile Arg Met Arg			
195	200	205	
aag aac agc ctg ctg cag aga cgg cag cct cgg cgg ctc tac gtg gtc			672
Lys Asn Ser Leu Leu Gln Arg Arg Gln Pro Arg Arg Leu Tyr Val Val			
210	215	220	
atc ctg act tcc gtc ctt gtc ttc ctt acc tgt tct ctg ccg ttg ggc			720
Ile Leu Thr Ser Val Leu Val Phe Leu Thr Cys Ser Leu Pro Leu Gly			
225	230	235	240
atc aac tgg ttc tta ctc tac tgg gtg gaa ctg ccg cag gcc gtg agg			768
Ile Asn Trp Phe Leu Leu Tyr Trp Val Glu Leu Pro Gln Ala Val Arg			
245	250	255	
ctc ctg tac gtc tgc tca tca cgc ttc tcc tcg tct ttg agc agc agc			816
Leu Leu Tyr Val Cys Ser Ser Arg Phe Ser Ser Ser Leu Ser Ser Ser			
260	265	270	
gcc aac cca gtc atc tac ttc ctc gtg ggc agc cag aag agc cac cgg			864
Ala Asn Pro Val Ile Tyr Phe Leu Val Gly Ser Gln Lys Ser His Arg			
275	280	285	
ctg cag gag tct ctg ggt gct gtg ctg ggg cgg gca ctt cag gac gag			912
Leu Gln Glu Ser Leu Gly Ala Val Leu Gly Arg Ala Leu Gln Asp Glu			
290	295	300	
cct gaa ggc agg gag acg cca tcc aca tgt act aat gat ggg gtc			957
Pro Glu Gly Arg Glu Thr Pro Ser Thr Cys Thr Asn Asp Gly Val			
305	310	315	
<210> 2			
<211> 319			

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 2

Met Asn Tyr Thr Pro Tyr Ser Ser Pro Ala Pro Gly Leu Thr Ile Ser
1 5 10 15
Pro Thr Met Asp Pro Val Thr Trp Val Tyr Phe Ser Val Thr Phe Leu
20 25 30
Ala Met Ala Thr Cys Val Cys Gly Ile Val Gly Asn Ser Met Val Ile
35 40 45
Trp Leu Leu Ser Phe His Ser Val Gln Arg Ser Pro Phe Cys Thr Tyr
50 55 60
Val Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Phe Leu Leu Cys Met Ala
65 70 75 80
Ser Leu Leu Ser Leu Glu Thr Gly Pro Leu Leu Thr Ala Ser Thr Ser
85 90 95
Ala Arg Val Tyr Glu Gly Met Lys Arg Ile Lys Tyr Phe Ala Tyr Thr
100 105 110
Ala Gly Leu Ser Leu Leu Thr Ala Ile Ser Thr Gln Arg Cys Leu Ser
115 120 125
Val Leu Phe Pro Ile Trp Tyr Lys Cys His Arg Pro Gln His Leu Ser
130 135 140
Gly Val Val Cys Gly Val Leu Trp Ala Leu Ala Leu Leu Met Asn Phe
145 150 155 160
Leu Ala Ser Phe Phe Cys Val Gln Phe Trp His Pro Asp Lys Tyr Gln
165 170 175
Cys Phe Lys Val Asp Met Val Phe Asn Ser Leu Ile Leu Gly Ile Phe
180 185 190

Met Pro Val Met Val Leu Thr Ser Ala Ile Ile Phe Ile Arg Met Arg
 195 200 205
 Lys Asn Ser Leu Leu Gln Arg Arg Gln Pro Arg Arg Leu Tyr Val Val
 210 215 220
 Ile Leu Thr Ser Val Leu Val Phe Leu Thr Cys Ser Leu Pro Leu Gly
 225 230 235 240
 Ile Asn Trp Phe Leu Leu Tyr Trp Val Glu Leu Pro Gln Ala Val Arg
 245 250 255
 Leu Leu Tyr Val Cys Ser Ser Arg Phe Ser Ser Ser Leu Ser Ser Ser
 260 265 270
 Ala Asn Pro Val Ile Tyr Phe Leu Val Gly Ser Gln Lys Ser His Arg
 275 280 285
 Leu Gln Glu Ser Leu Gly Ala Val Leu Gly Arg Ala Leu Gln Asp Glu
 290 295 300
 Pro Glu Gly Arg Glu Thr Pro Ser Thr Cys Thr Asn Asp Gly Val
 305 310 315

<210> 3

<211> 963

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (963)

<223>

<400> 3

atg aac cag act ttg aat agc agt ggg acc gtg gag tca gcc cta aac

48

Met Asn Gln Thr Leu Asn Ser Ser Gly Thr Val Glu Ser Ala Leu Asn

1	5	10	15	
tat tcc aga ggg agc aca gtg cac acg gcc tac ctg gtg ctg agc tcc	96			
Tyr Ser Arg Gly Ser Thr Val His Thr Ala Tyr Leu Val Leu Ser Ser				
20	25	30		
ctg gcc atg ttc acc tgc ctg tgc ggg atg gca ggc aac agc atg gtg	144			
Leu Ala Met Phe Thr Cys Leu Cys Gly Met Ala Gly Asn Ser Met Val				
35	40	45		
atc tgg ctg ctg ggc ttt cga atg cac agg aac ccc ttc tgc atc tat	192			
Ile Trp Leu Leu Gly Phe Arg Met His Arg Asn Pro Phe Cys Ile Tyr				
50	55	60		
atc ctc aac ctg gcg gca gcc gac ctc ctc ttc ctc ttc agc atg gct	240			
Ile Leu Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu Leu Phe Leu Phe Ser Met Ala				
65	70	75	80	
tcc acg ctc agc ctg gaa acc cag ccc ctg gtc aat acc act gac aag	288			
Ser Thr Leu Ser Leu Glu Thr Gln Pro Leu Val Asn Thr Thr Asp Lys				
85	90	95		
gtc cac gag ctg atg aag aga ctg atg tac ttt gcc tac aca gtg ggc	336			
Val His Glu Leu Met Lys Arg Leu Met Tyr Phe Ala Tyr Thr Val Gly				
100	105	110		
ctg agc ctg ctg acg gcc atc agc acc cag cgc tgt ctc tct gtc ctc	384			
Leu Ser Leu Leu Thr Ala Ile Ser Thr Gln Arg Cys Leu Ser Val Leu				
115	120	125		
ttc cct atc tgg ttc aag tgt cac cgg ccc agg cac ctg tca gcc tgg	432			
Phe Pro Ile Trp Phe Lys Cys His Arg Pro Arg His Leu Ser Ala Trp				
130	135	140		
gtg tgt ggc ctg ctg tgg acg ctc tgt ctc ctg atg aac ggg ttg acc	480			
Val Cys Gly Leu Leu Trp Thr Leu Cys Leu Leu Met Asn Gly Leu Thr				

145	150	155	160	
tct tcc ttc tgc agc aag ttc ttg aaa ttc aat gaa gat cgg tgc ttc				528
Ser Ser Phe Cys Ser Lys Phe Leu Lys Phe Asn Glu Asp Arg Cys Phe				
	165	170	175	
agg gtg gac atg gtc cag gcc gcc ctc atc atg ggg gtc tta acc cca				576
Arg Val Asp Met Val Gln Ala Ala Leu Ile Met Gly Val Leu Thr Pro				
	180	185	190	
gtg atg act ctg tcc agc ctg acc ctc ttt gtc tgg gtg cgg agg agc				624
Val Met Thr Leu Ser Ser Leu Thr Leu Phe Val Trp Val Arg Arg Ser				
	195	200	205	
tcc cag cag tgg cgg cgg cag ccc aca cgg ctg ttc gtg gtg gtc ctg				672
Ser Gln Gln Trp Arg Arg Gln Pro Thr Arg Leu Phe Val Val Val Leu				
	210	215	220	
gcc tct gtc ctg gtg ttc ctc atc tgt tcc ctg cct ctg agc atc tac				720
Ala Ser Val Leu Val Phe Leu Ile Cys Ser Leu Pro Leu Ser Ile Tyr				
	225	230	235	240
tgg ttt gtg ctc tac tgg ttg agc ctg ccg ccc gag atg cag gtc ctg				768
Trp Phe Val Leu Tyr Trp Leu Ser Leu Pro Pro Glu Met Gln Val Leu				
	245	250	255	
tgc ttc agc ttg tca cgc ctc tcc tcg tcc gta agc agc agc gcc aac				816
Cys Phe Ser Leu Ser Arg Leu Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Ala Asn				
	260	265	270	
ccc gtc atc tac ttc ctg gtg ggc agc cgg agg agc cac agg ctg ccc				864
Pro Val Ile Tyr Phe Leu Val Gly Ser Arg Arg Ser His Arg Leu Pro				
	275	280	285	
acc agg tcc ctg ggg act gtg ctc caa cag gcg ctt cgc gag gag ccc				912
Thr Arg Ser Leu Gly Thr Val Leu Gln Gln Ala Leu Arg Glu Glu Pro				

290 295 300
 gag ctg gaa ggt ggg gag acg ccc acc gtg ggc acc aat gag atg ggg 960
 Glu Leu Glu Gly Gly Glu Thr Pro Thr Val Gly Thr Asn Glu Met Gly
 305 310 315 320
 gct 963
 Ala
 <210> 4
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Met Asn Gln Thr Leu Asn Ser Ser Gly Thr Val Glu Ser Ala Leu Asn
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Gly Ser Thr Val His Thr Ala Tyr Leu Val Leu Ser Ser
 20 25 30
 Leu Ala Met Phe Thr Cys Leu Cys Gly Met Ala Gly Asn Ser Met Val
 35 40 45
 Ile Trp Leu Leu Gly Phe Arg Met His Arg Asn Pro Phe Cys Ile Tyr
 50 55 60
 Ile Leu Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu Leu Phe Leu Phe Ser Met Ala
 65 70 75 80
 Ser Thr Leu Ser Leu Glu Thr Gln Pro Leu Val Asn Thr Thr Asp Lys
 85 90 95
 Val His Glu Leu Met Lys Arg Leu Met Tyr Phe Ala Tyr Thr Val Gly
 100 105 110
 Leu Ser Leu Leu Thr Ala Ile Ser Thr Gln Arg Cys Leu Ser Val Leu
 115 120 125

Phe Pro Ile Trp Phe Lys Cys His Arg Pro Arg His Leu Ser Ala Trp
130 135 140
Val Cys Gly Leu Leu Trp Thr Leu Cys Leu Leu Met Asn Gly Leu Thr
145 150 155 160
Ser Ser Phe Cys Ser Lys Phe Leu Lys Phe Asn Glu Asp Arg Cys Phe
165 170 175
Arg Val Asp Met Val Gln Ala Ala Leu Ile Met Gly Val Leu Thr Pro
180 185 190
Val Met Thr Leu Ser Ser Leu Thr Leu Phe Val Trp Val Arg Arg Ser
195 200 205
Ser Gln Gln Trp Arg Arg Gln Pro Thr Arg Leu Phe Val Val Val Leu
210 215 220
Ala Ser Val Leu Val Phe Leu Ile Cys Ser Leu Pro Leu Ser Ile Tyr
225 230 235 240
Trp Phe Val Leu Tyr Trp Leu Ser Leu Pro Pro Glu Met Gln Val Leu
245 250 255
Cys Phe Ser Leu Ser Arg Leu Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Ala Asn
260 265 270
Pro Val Ile Tyr Phe Leu Val Gly Ser Arg Arg Ser His Arg Leu Pro
275 280 285
Thr Arg Ser Leu Gly Thr Val Leu Gln Gln Ala Leu Arg Glu Glu Pro
290 295 300
Glu Leu Glu Gly Gly Glu Thr Pro Thr Val Gly Thr Asn Glu Met Gly
305 310 315 320
Ala

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 5

ggctttcgaa tgcacaggaa 20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 6

cgtggaagcc atgctgaag 19

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe, labeled 5'-terminal with FAM and 3'-terminal with TAMRA

<400> 7

ttctgcatct atatcctcaa cctggcgg 28

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

tgatgaactt cctggcttct ttc 23

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

tgtccacctt gaagcactgg ta 22

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe, labeled 5'-terminal with FAM and 3'-terminal with TAMRA

<400> 10

ctgtgttcaa ttctggcatc ccgacaa 27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/03828

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/17, 39/395, 45/00, 48/00, A61P9/00, 11/00, 13/00,
15/00, 21/00, 25/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00-38/58, 39/395-39/44, 45/00, 45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 01/70814 A2 (BAYER AG.), 27 September, 2001 (27.09.01), See, especially, Claim 17 & WO 01/70814 A3 & EP 1268548 A2	1-10, 25-33, 42-45 11-24, 34-39
X A	WO 01/83748 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 08 November, 2001 (08.11.01), Particularly, Claim 30 & JP 2002-345471 A2	1-10, 25-33, 42-45 11-24, 34-39
A	DONG, Xinzhong et al., A Diverse Family of GPCRs Expressed in Specific Subsets of Nociceptive Sensory Neurons, Cell, 07 September, 2001 (07.09. 01), Vol.106, No.5, pages 619 to 632	1-39, 42-45

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
01 July, 2003 (01.07.03)

Date of mailing of the international search report
29 July, 2003 (29.07.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03828

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1122313 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 08 August, 2001 (08.08.01), & WO 00/20580 A1 & CA 2344976 A & AU 9960050 A1 & JP 2000-175691 A	1-39,42-45
A	WO 01/57085 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.), 09 August, 2001 (09.08.01), & WO 01/57085 A3 & EP 1252188 A2	1-39,42-45
A	WO 01/48188 A1 (Helix Research Institute), 05 July, 2001 (05.07.01), & AU 2001022303 A & EP 1243648 A1	1-39,42-45
A	WO 01/36471 A2 (ARENA PHARMACEUTICALS, INC.), 25 May, 2001 (25.05.01), & WO 01/36471 A3 & EP 1242448 A2	1-39,42-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03828

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 40, 41
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in claims 40 and 41 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/17, 39/395, 45/00, 48/00, A61P9/00, 11/00, 13/00, 15/00, 21/00, 25/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/00-38/58, 39/395-39/44, 45/00, 48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG) SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/70814 A2 (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 2001.09.27 See, especially claim 17.	1-10, 25-33, 42-45
A	& WO 01/70814 A3 & EP 1268548 A2	11-24, 34-39
X	WO 01/83748 A1 (武田薬品工業株式会社) 2001.11.08 特に、請求の範囲30を参照。	1-10, 25-33, 42-45
A	& JP 2002-345471 A2	11-24, 34-39

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.07.03

国際調査報告の発送日

29.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生



4P

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	DONG, Xinzhong et al., A Diverse Family of GPCRs Expressed in Specific Subsets of Nociceptive Sensory Neurons, Cell, September 7, 2001, Volume 106, Number 5, pages 619-632	1-39, 42-45
A	EP 1122313 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 2001.08.08 & WO 00/20580 A1 & CA 2344976 A & AU 9960050 A1 & JP 2000-175691 A	1-39, 42-45
A	WO 01/57085 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.) 2001.08.09 & WO 01/57085 A3 & EP 1252188 A2	1-39, 42-45
A	WO 01/48188 A1 (株式会社ヘリックス研究所) 2001.07.05 & AU 2001022303 A & EP 1243648 A1	1-39, 42-45
A	WO 01/36471 A2 (ARENA PHARMACEUTICALS, INC.) 2001.05.25 & WO 01/36471 A3 & EP 1242448 A2	1-39, 42-45

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 40, 41 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲40, 41に記載の発明は、治療による人体の処置方法に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。